Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia

UMBERTO DEMONER RAMOS

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DA
SUPERFÍCIE DE IMPLANTES NA RE-OSSEOINTEGRAÇÃO APÓS A
PERIIMPLANTITE INDUZIDA POR LIGADURA. ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO E MICROBIOLÓGICO EM CÃES.**

Ribeirão Preto

2016

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia

UMBERTO DEMONER RAMOS

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DA
SUPERFÍCIE DE IMPLANTES NA RE-OSSEOINTEGRAÇÃO APÓS A
PERIIMPLANTITE INDUZIDA POR LIGADURA. ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO E MICROBIOLÓGICO EM CÃES.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto – USP como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.

**Co-orientadora: Flávia Adelino Suaid
Malheiros**

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ramos, Umberto Demoner

Comparação entre dois métodos de descontaminação da superfície de implantes na re-osseointegração após a periimplantite induzida por ligadura. Estudo histomorfométrico e microbiológico em cães. Ribeirão Preto, 2016

113p.: il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Novaes Jr., Arthur Belém

1. periimplantite, 2. regeneração óssea guiada,
3. antibióticos, 4. terapia fotodinâmica antimicrobiana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Umberto Demoner Ramos

Comparação entre dois métodos de descontaminação da superfície de implantes na re-osseointegração após a periimplantite induzida por ligadura. Estudo histomorfométrico e microbiológico em cães.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto – USP como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr.

Co-orientadora: Flávia Adelino Suaid Malheiros

Aprovado em: ____/____/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, por serem o exemplo de caráter, ética e excelência, em **nossa** profissão.*

*Ao meu pai, **Umberto Alfredo Ramos**, e mãe, **Norma Elisa Demoner Ramos**, por me influenciarem, mesmo que não sabendo, a seguir esta bela profissão; por me incentivarem a seguir o caminho da atualização e crescimento profissional em busca deste sonho. Sem eles, nada seria possível.*

*À minha namorada, **Iara Pezzin Canal**, por todo apoio, mesmo que a distância na maior parte desta caminhada. Obrigado por existir em minha vida.*

À minha família, que mesmo distante, demonstrava o orgulho por minha luta.

Amo vocês!

Agradecimentos

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr**, pela disponibilidade e por ter me permitido o privilégio de levar em meu currículo e formação seu nome como orientador, além das oportunidades por ele proporcionadas durante esses quase 4 anos de doutorado.*

Aos Docentes do programa, Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza pela amizade e abertura de novas oportunidades, além do bom convívio. Ao Prof. Dr. Mário Taba Jr. pelos agradáveis momentos e ideias trocadas sobre pesquisa e periodontia, e também pelas famosas repostas-pergunta. Ao Prof. Dr. Michel Reis Messora pelos ensinamentos e troca de experiências, principalmente durante os seminários de literatura e conversas informais. À Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto pelos ensinamentos transmitidos.

*Aos meus colegas de Doutorado, **Carolina Delmondes, Carolina Mandetta e Gustavo Henrique Apolinário**, pelos bons momentos de alegria e de suporte mútuos nas horas mais difíceis e árduas de nosso curso. E nossos outros futuros doutores, **Cristine Borges BRUM (Cris), Paula Gabriela Pessoa (PG), Felipe Anderson dos Santos, Mariana Sales, Kelly**,*

*Aos Mestrandos **Carla, Milena, Camila, Jéssica, Sérgio Lago, Felipe Torres, Luiz Fernando, Gabriel Bastos** pelo bom convívio na clínica de pós-graduação, e fora dela.*

*Aos amigos que fiz durante estes anos de Pós-graduação, **Lívia Moretti, Tulio Pignaton, Janine Montenegro, Carolina Scanavez, Igor Almeida, Lauro Ayub, Danilo Maeda Reino, Luciana Maia, Patricia Garani**, entre outros mais.*

*As secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial e Periodontia, **Tatiana Angeli Passos Fernandes (Tati), Dulce de Oliveira Nergretti e Carla Daniela Lima (Dani)** pela disposição em ajudar e pela amizade construída.*

*Às funcionárias da clínica de Pós Graduação **Dani, Sueli (Su) e Dona Joana, Dona Laura** pela boa companhia diária e ajuda nos atendimentos.*

*Às Secretárias da Seção de Pós Graduação, **Isabel Sola, Regiane Sacilotto** e Mary Possani pela disponibilidade e cordialidade no atendimento às nossas recorrentes necessidades.*

*Aos funcionários do Biotério II, **Aldo e Edson (Marmita)** por toda ajuda com o trato dos animais utilizados neste estudo, fazendo com que este experimento tivesse sido possível.*

*À **Adriana Luisa Gonçalves de Almeida** pela amizade e por toda a ajuda no laboratório de análise de imagens tridimensionais e tecidos.*

*À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** pela estrutura oferecida, que possibilita aos estudantes de Pós-graduação a realização de pesquisas de nível internacional.*

*À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo**, por me fornecer o conhecimento necessário para que eu tenha me tornado, antes de Periodontista e Mestre em Periodontia, Cirurgião-Dentista.*

“Senso comum é o conjunto de preconceitos

adquiridos pelo indivíduo até

meados de seus 18 anos”

(Albert Eistein)

Acknowledgments:

*To the friends, and also Family, I've made in Augusta, **Mariana Rabelo, Amanda Stadler, Carlos Heitor Cunha Moreira (and Mirna, Luisa and Camila), Lisiane Susin, Dresley Lourenço, Teri Wiksejö, Joseph Capetillo, Thais Borin, and my roommate, Manoj Mathew,** who received me as a brother in Augusta. Without you guys, it would be much more difficult my "USA journey", this bond will be for life.*

*To my two bosses, **Ulf Wikesjö and Cristiano Susin** for the support at Augusta University before, during, and after my fellowship, and to teach me about Science, periodontal regeneration and of course, how to "run against the flow". You are an example to me.*

***"Common sense is the collection
of prejudices acquired
by age eighteen"
(Albert Einstein)***

RESUMO

Introdução: A doença periimplantar caracteriza-se pela perda óssea progressiva em implantes dentais osseointegrados. Sua origem é bacteriana, e acomete cerca de 20% da população com reabilitações implantossuportadas. O sucesso do tratamento parece depender da desinfecção da superfície dos implantes para resolução da inflamação, e da configuração dos defeitos ósseos para a regeneração dos tecidos. Até o momento, não há protocolos bem estabelecidos para a desinfecção da superfície de implantes osseointegrados. O objetivo deste estudo foi comparar dois métodos de desinfecção da superfície de implantes, e o efeito do uso da regeneração óssea guiada no tratamento da periimplantite induzida em cães. **Materiais e Método:** Oito cães beagle receberam 8 implantes cada. Após 8 semanas, ligaduras de seda foram posicionadas, e removidas após mais 8 semanas. O tratamento foi realizado após 10 semanas, por meio de desinfecção com a terapia fotodinâmica antimicrobiana ou aplicação tópica tetraciclina 50mg/ml, com ou sem procedimentos de regeneração óssea guiada associados. Durante o tratamento foram coletadas amostras microbiológicas por meio de um *swab* com *microbrush* estéril antes do tratamento, e imediatamente após o tratamento. A eutanásia ocorreu 12 semanas após o tratamento para processamento histológico. Os desfechos de tratamento analisados foram: ganho ósseo linear (mm), ganho ósseo (%), reosseointegração (%), redução bacteriana total e proporcional após o tratamento (%). **Resultados:** Os resultados gerais não demonstraram diferenças significantes entre os grupos quando comparados os métodos de desinfecção, e o uso ou não de procedimentos regenerativos. O uso da regeneração óssea guiada não resultou em melhoras no ganho ósseo, e sítios vestibulares apresentaram piores resultados regenerativos. A exposição precoce ao meio bucal afetou negativamente os resultados do tratamento, independente do grupo. **Conclusão:** Ambas terapias antiinfeciosas, associadas ou não a procedimentos regenerativos, obtiveram sucesso na resolução da inflamação e desinfecção da superfície dos implantes, com ganho ósseo parcial, sem o uso de antibioticoterapia sistêmica.

Palavras-chave: periimplantite, regeneração óssea guiada, antibióticos, terapia fotodinâmica antimicrobiana.

ABSTRACT

Objectives: This study used a dog model to evaluate two anti-infective treatment protocols for the treatment of periimplantitis with or without the use of guided bone regeneration (GBR).

Material and Methods: Eight beagle dogs received eight implants each. After 8 weeks, silk ligatures were installed and then removed after 8 weeks, and after the end of 10 weeks the lesions were treated either with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) or topical tetracycline hydrochloride 50mg/ml with and without guided bone regeneration. Microbiological samples were collected with sterile microbrush before, and immediately after treatment. The animals were euthanized 12 weeks after treatment and submitted to histological processing. The outcomes evaluated included: linear bone gain (mm), bone gain (%), re-osseointegration (%), bacteria total counts before and after each treatment, and proportions of microorganisms. The effects of the implant site, early exposure and type of anti-infective treatment on bone regeneration were evaluated. **Results:** Both treatment presented success on decontamination of implant surface, with no difference between them. The overall results failed to detect significant differences between the anti-infective treatments and the adjunctive use of guided bone regeneration failed provide better re-osseointegration or bone gain in either of the anti-infective treatments. Buccal sites and implant early exposure negatively affect bone regeneration. **Conclusion:** Both anti-infective therapies successfully decontaminated implant surface. Stand-alone or combined with guided bone regeneration allowed similar and partial bone gain, without the use of systemic antibiotics.

Keywords: periimplantitis, guided bone regeneration, antibiotics, antimicrobial photodynamic therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFA:	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TTC:	Tetraciclina
DP:	Desvio padrão
mg:	miligrama
ml:	mililitro
TPI:	Tempo Pré Irradiação
mW:	miliwatt
cm²:	centímetro quadrado
J:	Joules
nm:	nanômetro
mm:	milímetro
N:	newtons
Laser:	light amplification by stimulated emmitted radation
min:	minutos

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1 Contexto histórico, etiologia e progressão.....	13
1.2 Modelos experimentais e métodos de indução	14
1.3 Tratamento: Objetivos e modalidades.....	15
1.4 Tratamento não cirúrgico	16
1.4.1 Tratamentos adjuvantes.....	17
1.5 Tratamento cirúrgico.....	18
1.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	19
1.7 regeneração óssea guiada	20
 2 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS	 22
 3 MATERIAIS E MÉTODO	 23
3.1 Seleção dos animais	23
3.2 Primeira Fase Cirúrgica: extrações	23
3.3 Segunda Fase Cirúrgica: instalação dos implantes e indução da periimplantite	25
3.4 Terceira Fase Cirúrgica: tratamento da periimplantite induzida	27
3.5 Eutanásia e Processamento Histológico	33
3.6 Forma de análise dos resultados.....	33
3.6.1 Técnica de Checkerboard DNA-DNA Hybridization.....	33
3.6.1.1 Hibridização das membranas com as sondas de DNA.....	33
3.6.1.2 Sondas de DNA.....	34
3.6.1.3 Detecção das espécies.....	34
3.6.1.4 Análise Estatística.....	36
3.6.2 Histomorfometria.....	36
3.6.2.1 Análise estatística.....	37
 4 RESULTADOS.....	 38
4.1 Histomorfometria	38
4.1.1 Características dos defeitos	38
4.1.2 Desfecho do tratamento.....	38
4.2 Microbiologia	43

5 DISCUSSÃO	47
5.1 Modelo experimental: limitações e possibilidades	47
5.1.1 Histomorfometria.....	47
5.1.2 Microbiologia	48
5.2 Ganho ósseo vertical e re-osseointegração	50
5.3 Redução da microbiota	51
 6 CONCLUSÃO	 53
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 54
 ANEXOS	 70
Anexo 1- Artigo em ingles Histomorfometria.....	70
Anexo 2- Artigo em Inglês Microbiologia.....	96

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Contexto histórico, etiologia e progressão

A doença periimplantar, como a doença periodontal, tem como fator etiológico primário o acúmulo de biofilme nas superfícies do pilar protético, cicatrizador e implante (Tonetti et al., 2015). Na atualidade, é subdividida em dois tipos: mucosite, onde há inflamação da mucosa periimplantar, e periimplantite, quando a infecção e inflamação atingem os tecidos de suporte periimplantares (osso periimplantar) (Lang et al., 2011). Quando instalada, a periimplantite pode ser classificada em inicial, moderada e severa, de acordo com sinais e sintomas clínicos como profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e supuração, aliados à uma radiografia periapical (Froum and Rosen, 2012).

O primeiro relato de falha em implantes relacionada a infecção data do início dos anos 90 (Becker et al., 1990), cerca de 21 anos após a descrição da osseointegração (Branemark et al., 1969). Quatro anos mais tarde, no primeiro workshop da Federação Europeia de Periodontia, as doenças periimplantares começaram a ser discutidas (Albrektsson and Isidor, 1994), e a origem bacteriana estabelecida.

Com a popularização da técnica de instalação de implantes, a partir do final da década de 90 e início de 2000, o número de implantes instalados cresceu de forma exponencial, juntamente com o aumento do número de implantes com infecção e perda óssea progressiva, principalmente após os 5 primeiros anos pós carga. Os dados epidemiológicos diferem bastante, principalmente em relação a prevalência (1 a 47% dos indivíduos), e a definição de doença (Derks and Tomasi, 2015).

A incidência da doença periimplantar está relacionada ao controle de placa em pacientes em manutenção periodontal (Aguirre-Zorzano et al., 2014, Ferreira et al., 2006), e a enxertia prévia ou não (Canullo et al., 2015).

Recentemente, a etiologia bacteriana foi questionada por alguns autores (Albrektsson et al., 2014). Segundo eles, a infecção ocorreria secundariamente à uma reação de corpo estranho inicial. Esta hipótese ainda não possui confirmação, e parece ir de encontro às observações clínicas, que apontam para a similaridade entre o início e a susceptibilidade das doenças periodontal e periimplantar (Salvi et al., 2012). Somado a isso, a mucosite periimplantar experimental em humanos (Zitzmann et al., 2001, Pontoriero et al., 1994) se mostra reversível quando avaliada clinicamente e por meio de marcadores inflamatórios, com o retorno da higiene oral (Salvi et al., 2012), tal qual a gengivite (Loe et al., 1965). Esta associação fica ainda mais clara quando a incidência da periimplantite, em pacientes portadores de doença periodontal e

reabilitações com implantes osseointegrados, com e sem bolsas residuais é comparada (Cho-Yan Lee et al., 2012).

Há evidências de contaminação de sítios periimplantares por bactérias presentes na bolsa periodontal, agindo como um reservatório (Sumida et al., 2002, Aoki et al., 2012), razão pela qual a recomendação de controle estrito da doença periodontal é aconselhada, previamente à reabilitação com implantes (van Winkelhoff et al., 2000). No que tange a etiologia, parece claro que o precursor inicial das doenças periimplantares é o biofilme formado nas superfícies do implante osseointegrado e seus componentes.

A microbiota presente nas doenças periimplantares tem sido estudada por diversas técnicas e métodos (Agerbaek et al., 2006, Quirynen et al., 2006, Shibli et al., 2008, Koyanagi et al., 2010). A colonização bacteriana dos componentes dos implantes parece iniciar com predominância de bactérias do complexo roxo como a *Veillonella parvula* no fluido gengival após 30 minutos da instalação do implante, com uma sucessão que culmina na colonização por bactérias do complexo vermelho e laranja de 2 a 8 semanas após (Furst et al., 2007, Quirynen et al., 2006), se assemelhando a re-colonização de dentes (Uzel et al., 2011).

A composição microbiana da doença já instalada se assemelha à da doença periodontal, com predominância de bactérias do complexo vermelho e laranja quando analisada pela técnica de hibridização DNA-DNA (Shibli et al., 2008). Quando técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (PCR real time) são utilizadas, o biofilme periimplantar mostra-se mais complexo, com bactérias como a *Parvimonas micra*, que não são detectadas nas periodontites (Koyanagi et al., 2010, Koyanagi et al., 2013). Somado a isso, a contaminação bacteriana parece capaz de penetrar, além da superfície externa do implante, as conexões internas (Cosyn et al., 2011).

A reação dos tecidos periimplantares à agressão bacteriana aparenta ser diferente dos tecidos periodontais, com infiltrado inflamatório disperso e localizado mais apicalmente (Berglundh et al., 2011), aumentando a penetração da sonda quando a doença está instalada (Schou et al., 2002).

Apesar das semelhanças encontradas com a periodontite crônica, a periimplantite apresenta progressão contínua (Zitzmann et al., 2004, Berglundh et al., 2007, Albouy et al., 2009) e mais rápida que a doença periodontal (Carcuac et al., 2013).

1.2 Modelos experimentais e métodos de indução

O primeiro relato de periimplantite induzida comparou a reação de tecidos periodontais e periimplantares ao acúmulo de placa (Lindhe et al., 1992). Há relatos do uso de primatas não

humanos através da instalação de ligaduras de algodão inseridas no sulco periimplantar de forma a expor os implantes ao acúmulo de placa por 9 meses (Warrer et al., 1995) ou 10 meses (Hanisch et al., 1997a, Hanisch et al., 1997c). Alguns autores relatam o uso adicional de elásticos ortodônticos para manutenção das ligaduras em posição, e a inoculação de cepas de *Porphyromons gingivalis* (Schou et al., 2003).

A indução da doença periimplantar em cães foi considerada recentemente como modelo experimental padrão ouro para o estudo das doenças periimplantares devido à facilidade de manuseio, e a semelhança entre os defeitos encontrados na periimplantite induzida em cães e a em humanos (Schwarz et al., 2007, Schwarz et al., 2012a). Por meio de ligaduras de algodão ou seda, após completa osseointegração sem carga dos implantes, e tempo de acúmulo de placa de 2 a 4 meses com a ligadura em posição, seguido da remoção da ligadura e espera, ou não, de 1 mês para realização do tratamento (Ericsson et al., 1996, Wetzell et al., 1999). Alguns estudos relatam instalação de novas ligaduras mensalmente, por um período de 3 meses, seguido de remoção e espera de 1 mês para o tratamento (Persson et al., 1999).

Algumas modificações têm sido utilizadas, obtendo o mesmo padrão de perda óssea, como o uso de fio de aço cirúrgico associado a um fio de sutura de poliéster multifilamentoso (Zechner et al., 2004) ou não (Namgoong et al., 2015, You et al., 2007). Apesar da maioria dos estudos aguardarem o tempo de osseointegração antes da instalação do implante, os resultados da indução parecem não diferir se realizados logo após instalação imediata em alvéolos, ou de maneira tardia, pós osseointegração (Park et al., 2015).

Os tipos de defeito foram recentemente classificados de acordo com sua configuração, sendo chamados de Ia, Ib, Ic, Id, Ie e II; o defeito Ia uma perda tipo deiscência apenas na face vestibular, Ib perda tipo deiscência na superfície vestibular, associada com um defeitos infraósseos nas proximais, Ic deiscência óssea na superfície vestibular e defeitos infraósseos contidos nas proximais e lingual, Id deiscência óssea nas faces livres associadas a defeitos infraósseos nas faces proximais; Ie defeitos infraósseos contidos nas 4 faces, e II quando há perda óssea horizontal (Schwarz et al., 2007). No entanto, poucos estudos em animais relatam a distribuição desses defeitos.

1.3 Tratamento: Objetivos e modalidades

O objetivo geral primário do tratamento de qualquer infecção é a remoção da causa. Secundariamente, a regeneração dos tecidos perdidos deve ocorrer, quando possível. Persson et al. (2001b) demonstraram a importância da qualidade da superfície do implante na re-

osseointegração de defeitos periimplantares. Neste estudo a periimplantite foi induzida até que se atingisse uma perda de 50% do osso ao redor do implante. O tratamento incluiu administração de antibiótico sistêmico e limpeza mecânica *in situ* com bolinhas de algodão embebidas em solução salina (G1) ou troca por uma peça nova da parte coronal do implante. Os resultados demonstraram falha na re-osseointegração em G1, enquanto G2 apresentou ocorrência consistente de osseointegração.

Atualmente não há tratamento padrão ouro para a periimplantite. O tratamento da mucosite periimplantar não difere da gengivite, sendo o controle de placa pelo profissional suficiente para a resolução da inflamação. Tratamentos adjuvantes não aparentam ter benefício adicional (Salvi and Ramseier, 2015). A terapia mecânica não cirúrgica, no entanto, parece não ocasionar reduções da profundidade clínica de sondagem expressivas, nem reduções importantes na microbiota periimplantar em estudos clínicos randomizados (Renvert et al., 2009, Persson et al., 2010).

A exemplo da raspagem e alisamento radicular (Waerhaug, 1978), o debridamento não cirúrgico dos implantes osseointegrados com curetas torna-se de difícil execução em consequência dos obstáculos como as espiras, e a própria rugosidade de superfície dos implantes (Sul et al., 2005). A rugosidade de superfície, importante para a qualidade e rapidez da osseointegração (Wennerberg and Albrektsson, 2009), também contribui para maior acúmulo de biofilme (Elter et al., 2008, Teughels et al., 2006). O uso de antibióticos apresenta resolução da inflamação, com preenchimento ósseo do defeito e uma fina camada de tecido conjuntivo separando o implante do osso, não restaurando o contato osso-implante (Wetzel et al., 1999, Persson et al., 1999).

O tipo de superfície aparenta influenciar o resultado do debridamento mecânico associado ao acesso cirúrgico. Implantes com tratamento de superfície por anodização demonstraram pior desempenho pós tratamento (Albouy et al., 2011); implantes com tratamento duplo de superfície (ataque ácido e jateamento) demonstraram boas respostas, semelhantes a superfície lisa em termos de resolução da inflamação (Albouy et al., 2011), e melhores resultados em relação ao contato osso-implante (Parlar et al., 2009).

1.4 Tratamento não cirúrgico

O tratamento não cirúrgico pode ser realizado de diversas formas. A mais comum é o debridamento com curetas que podem ser de material plástico ou de titânio. Curetas plásticas demonstraram não afetar a rugosidade de superfície dos implantes (Fox et al., 1990). Mais

recentemente foi proposto o uso de jatos abrasivo de glicina, um material biologicamente seguro e menos agressivo que o jateamento com bicarbonato de sódio (Petersilka et al., 2008). Em estudos clínicos, porém, o debridamento não cirúrgico mostra-se ineficaz para a resolução da inflamação e infecção tanto com curetas manuais, como com instrumentos ultrassônicos e jatos abrasivos (Persson et al., 2010, Renvert et al., 2011).

O tratamento não cirúrgico com *lasers* de alta potência ER:YAG foi proposto após estudos *in vitro* demonstrarem eficácia na remoção de biofilme aderido a superfícies de titânio, resultando em uma superfície biocompatível (Kreisler et al., 2005, Kreisler et al., 2002). Somado a isto, o uso do laser dispensaria o procedimento de anestesia e reduziria o tempo de tratamento. Um estudo pré-clínico em cães demonstrou tendência a maior contato osso implante pós tratamento, quando comparado ao uso de curetas (Takasaki et al., 2007, Yamamoto and Tanabe, 2013). Estudos clínicos controlados demonstraram superioridade do uso de *lasers* em relação ao uso de curetas plásticas, porém, os benefícios são mantidos por apenas 6 meses (Schwarz et al., 2006a). Estudos clínicos aleatorizados não demonstraram diferença entre o uso do *laser* e o jato abrasivo de glicina no tratamento não cirúrgico, com resultados pobres para ambos (Renvert et al., 2011).

1.4.1 Tratamentos adjuvantes

Diversas estratégias adjuntas ao debridamento não cirúrgico com curetas têm sido propostas. O uso de agentes locais como a clorexidina a 0.12% associado à aplicação subgingival de gel de clorexidina 1% como adjuvante ao uso de curetas manuais resultou em ganho de inserção clínica insignificante, e menores reduções no sangramento à sondagem após 12 meses, quando comparados a uso de jato abrasivo (John et al., 2015).

A aplicação de microesferas de minociclina associada a clorexidina gel não demonstrou reduções significativas na microbiota potencialmente patogênica, especialmente nos níveis de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, além de não atingir a resolução da inflamação (Renvert et al., 2008, Persson et al., 2006, Renvert et al., 2006). Mais recentemente, resultados semelhantes aos antibióticos locais foram alcançados com o uso de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) com cloreto de fenotiazina 10 mg/ml (Bassetti et al., 2014). O uso da TFA paralisou a perda óssea periimplantar até seis meses em lesões moderadas, porém, em lesões severas não houve sucesso (Deppe et al., 2013). O uso da TFA com uma pasta a base de azuleno mostrou reduções significantes de bactérias do complexo laranja e desempenho similar ao uso de debridamento cirúrgico com uso adjunto de clorexidina 0.12%, em cães (Hayek et al., 2005). A utilização de

tratamento adjuvante parece não demonstrar melhoras clínicas que justifiquem seu uso em detrimento do uso apenas do debridamento mecânico (Faggion et al., 2014).

1.5 Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico possibilita acesso a áreas, muitas vezes não alcançadas com o tratamento não cirúrgico. A literatura relata inúmeros protocolos de descontaminação, incluído uso de antibióticos sistêmicos, quimioterápicos locais, *laser* de alta intensidade, condicionadores de superfície e, por vezes, remoção da superfície contaminada por meio de implantoplastia (Heitz-Mayfield et al., 2012, de Waal et al., 2014, Schwarz et al., 2012b, Schwarz et al., 2014, Schwarz et al., 2011a, Yamamoto and Tanabe, 2013).

O tratamento ressectivo envolvendo remoção da superfície do implante tem sido proposto como tratamento radical para descontaminação da superfície do implante (Romeo et al., 2007, Schwarz et al., 2015). Apesar da remoção com brocas, quando realizada de forma correta e sob abundante irrigação, não sobreaquece os tecidos a ponto de causar efeitos deletérios significativos (Sharon et al., 2013); a remoção das camadas mais externas, inclusive roscas dos implantes reduz significativamente a resistência a fratura do corpo do implante (Chan et al., 2013). Os efeitos deste tipo de tratamento na qualidade de superfície do implante ainda não estão claros.

Alternativas mais conservadoras tendem a manter as superfícies do implante intactas e, ao menos em teoria, mais propensas a uma re-osseointegração. O uso adjunto de clorexidina 0,12% associada ao cloreto de cetilpiridíneo 0,05% não demonstrou efeitos adicionais no tratamento cirúrgico, apesar de ter apresentado reduções de carga microbiana superiores durante o procedimento cirúrgico (de Waal et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados com o uso de uma solução de clorexidina a 2% (de Waal et al., 2014).

O uso de consagrados condicionadores radicular em periodontia como ácido cítrico (Wikesjö et al., 1991), EDTA (Lasho et al., 1983) e tetraciclina (Terranova et al., 1986) tem sido descrito para o tratamento da periimplantite (Park, 2012, Hanisch et al., 1997b). A maior parte desses agentes são utilizados na superfície radicular devido às suas propriedade quelantes, de remoção da *smear layer* e exposição das fibras colágenas dentinárias (Wikesjö et al., 1986), o uso em implantodontia justifica-se devido a propriedade de remoção de *debris* remanescentes da limpeza mecânica. O cloridrato de tetraciclina, em particular, apresenta substantividade antimicrobiana (Stabholz et al., 1993a, Stabholz et al., 1993b), sendo usado, por vezes, como antimicrobiano local (Sachdeva and Agarwal, 2011).

O interesse pelo uso de *lasers* em odontologia tem aumentado ao longo dos anos (DiVito et al., 2014). Muito embora tenha sido considerado promissor por seu efeito descontaminante *in vitro* (Kreiser et al., 2002), o uso do *laser* de alta potência, quando comparado a procedimentos menos custosos, como o brunimento da superfície com algodão embebido em soro fisiológico, não demonstrou efeito adicional (Schwarz et al., 2012b, Papadopoulos et al., 2015).

O uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) tem sido proposto na terapia da periimplantite como descontaminante local no tratamento cirúrgico da periimplantite (Dortbudak et al., 2001, Shibli et al., 2002). A TFA consiste na utilização de um corante fotossensibilizador, associado a uma fonte luminosa ressonante com o corante com o fim de ocasionar dano à estruturas celulares internas e externas da célula alvo, neste caso, a bactéria (Wainwright, 1998).

1.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Apesar de civilizações antigas apresentarem indícios da cura de certas enfermidades pela luz, o primeiro relato sobre o efeito da luz associada a um fotossensibilizador data do início do século XX, pelo estudante de medicina Oscar Raab, (Raab, 1900, Mitton and Ackroyd, 2005). Logo após, seu uso foi proposto para o tratamento de alguns cânceres de pele, com o uso da eosina e luz branca (von Tappeiner and Jesionek, 1903), sendo mais tarde a participação do oxigênio no processo que foi denominado “reação fotodinâmica” (von Trappeiner and Jodlabauer, 1904).

O uso terapêutico das reações fotodinâmicas ficou circunscrito ao tratamento do câncer até o final da década de setenta, quando os primeiros relatos de ação antimicrobiana foram publicados (Yoshikawa et al., 1978). Devido aos diferentes alvos terapêuticos, o termo “antimicrobiana” geralmente é agregado quando o efeito desejado é o combate a infecção (Zeina et al., 2002). Os fotossensibilizadores são caracterizados como moléculas aromáticas (Wainwright, 1998). Os sensibilizadores mais comumente, Azul de toluidina O e o Azul de metileno, utilizados em odontologia pertencem à família das fenotiazinas, principalmente por seu espectro de absorção estar entre $\lambda=620$ e 680nm (Meisel and Kocher, 2005, Wainwright, 1998).

O processo fotodinâmico envolve reações do tipo I e II. A reação fotodinâmica do tipo I envolve a subtração de H^+ de moléculas proteicas e ácidos nucleicos (DNA e RNA), causando desnaturação de proteínas, alterações no DNA e lise da membrana bacteriana. A reação de tipo II envolve a presença de moléculas de oxigênio e formação de radicais superóxidos (Wainwright, 1998).

A TFA não demonstra dano à estruturas periodontais (Luan et al., 2009). A foto-eficiência do processo depende de inúmeros fatores. A presença de proteínas, sangue e alta carga bacteriana demonstraram reduções da ação fotodinâmica (Bhatti et al., 1997, Usacheva et al., 2001). Concentrações e doses luminosas mais altas demonstraram melhores resultados quanto ao efeito bactericida (Usacheva et al., 2003, Qin et al., 2008a).

Embora inúmeros estudos pré-clínicos tenham sido realizados com o azul de toluidina e o azul de metileno, os fotossensibilizadores disponíveis comercialmente na atualidade utilizam o azul de metileno em variadas concentrações (de 0.001 a 10mg/ml) como matéria prima. Isto se deve, principalmente a ressonância do azul de metileno com os *lasers* comumente utilizados em odontologia ($\lambda=660-670\text{nm}$).

A TFA constitui um processo tempo-dependente, sendo sua ação circunstanciada enquanto a ativação luminosa ocorre. Com base nisso, diferentes protocolos têm relatado desfechos igualmente diferentes (Braun et al., 2008, de Oliveira et al., 2007, Lulic et al., 2009, Polansky et al., 2009, Moreira et al., 2015, Ramos et al., 2015). Protocolos com aplicações múltiplas de 10 segundos apresentam consistentemente melhores resultados (Lulic et al., 2009, Moreira et al., 2015, Ramos et al., 2015).

1.7 regeneração óssea guiada

A regeneração óssea guiada foi inicialmente reconhecida na literatura ortopédica, por Murray et al. (1957), discutindo a importância do tecido mole em prevenir a formação óssea, tendo discutido mais três fatores primordiais à regeneração óssea: presença de coágulo sanguíneo, osteoblastos viáveis, e contato com tecido vivo. Na odontologia, o conceito de regeneração tecidual guiada foi introduzido (Gottlow et al., 1986), e testado (Nyman et al., 1987), alcançando regeneração de tecidos periodontais através do uso de membranas de teflon.

Na implantodontia, o uso da regeneração óssea guiada com membranas foi inicialmente proposto para resolução de deiscências ósseas ao redor de implantes (Dahlin et al., 1989, Dahlin et al., 1991b). A associação com substitutos ósseos ou materiais de preenchimento foi advogada com o fim de evitar o colapso da membrana, que reduz a efetividade da neoformação óssea (Dahlin et al., 1991a, Mellonig and Nevins, 1995). Desde então esta associação tem demonstrado sucesso em sua utilização para recuperação de tecido duro perdido, tanto antes da implantação, como concomitante a ela (Aghaloo et al., 2016, Esposito et al., 2009). O substituto ósseo mais utilizado e estudado, até a atualidade, é a hidroxiapatita de origem bovina.

Recentemente um estudo em modelo animal testou o uso de diversas formatações desta hidroxiapatita, associada ou não a uma membrana colágena. Seu uso foi testado na regeneração de defeitos contidos, demonstrando ganho ósseo superior quando na utilização da membrana (Antunes et al., 2015). Clinicamente, o uso da ROG tem demonstrado bons resultados de ganho ósseo com preenchimento de defeitos no tratamento da periimplantite (Park, 2012, Roos-Jansaker et al., 2007, Schwarz et al., 2012b), porém poucas são as evidências quanto a qualidade óssea e o contato osso-implante alcançados com este tipo de terapia.

2 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

Este estudo possui dois objetivos sendo o primeiro, comparar a efetividade de dois métodos de descontaminação da superfície de implantes após a periimplantite induzida através da técnica de hibridização DNA-DNA; e, avaliar os efeitos do uso de procedimentos de Regeneração Óssea Guiada no ganho ósseo e re-osseointegração, através da análise histométrica e histomorfométrica.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Seleção dos animais

O protocolo desta pesquisa foi submetido ao comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto e aprovado sob o número 06.1.458.53.5.

Foram selecionados oito (8) cães Beagles, adultos jovens pesando aproximadamente 18 Kg, com mandíbula intacta, sem trauma oclusal, nem lesões virais ou fúngicas. Os animais apresentavam boa saúde geral, nenhum envolvimento sistêmico relevante e um acompanhamento com médico-veterinário responsável durante o decorrer da pesquisa. Os cães foram imunizados com vacinas, tratamento antiparasitário e submetidos a uma profilaxia dental para remoção e controle do biofilme dental por meio de instrumentos ultrassônicos (Cavitron®, Dentsply corporate, York, PA EUA) (figura 1).

3.2 Primeira Fase Cirúrgica: extrações

Os animais receberam 20.000 IU de penicilina e estreptomicina (1 Kg/10 kg) na noite anterior aos procedimentos cirúrgicos. Esta dose proveu uma cobertura antibiótica de amplo espectro por quatro dias, sendo administrada uma nova dose após este período, prolongando o efeito por uma semana de pós-operatório.

Durante o preparo para as cirurgias, os cães foram pré-anestesiados com zolazepan a 10% na concentração de 0,10ml/Kg e acepromazina na concentração 2%. A anestesia mantida através de anestésico inalatório, e os animais foram submetidos à intubação traqueal com uma sonda para adaptação de um dispositivo e administração do gás de isoflurano (oxigênio diluído volátil-2V%). Anestesias locais foram realizadas nas regiões dos pré-molares inferiores (P1, P2, P3 e P4) para controle da dor trans-operatória.

Os dentes foram seccionados ao meio, no sentido vestibulo-lingual a partir da região de bifurcação, possibilitando a extração individual das raízes mesial e distal, e, portanto, minimizando a possibilidade de trauma às paredes ósseas alveolares (Figura 2). Por fim, os retalhos foram posicionados e suturados com fio absorvível (Vicryl 5-0 Ethicon, São Jose dos Campos, Brasil) (figura 3). Após uma semana, os animais foram avaliados para assepsia da cavidade oral e remoção das suturas.

Figura 1. Dentes mandibulares após controle de placa inicial.

Figura 2. Dentes seccionados para exodontia.

Figura 3. Retalho suturado.

Nos cuidados pós-operatórios, foram utilizados: cloridato de tramadol (50mg/ml) na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e cetoprofeno 20mg na dosagem de 1 comprimido/20 kg como anti-inflamatório, seguido de Stomorgyl (Stomorgyl 10, Merial Saude Animal Ltda, Paulínia, SP, Brazil), na dosagem de 1 comprimido/10 kg, por 10 dias como terapia antibiótica. Foi mantida uma dieta leve por pelo menos 15 dias, e a cicatrização das regiões operadas foi acompanhada periodicamente. O controle de placa foi feito mensalmente.

3.3 Segunda Fase Cirúrgica: instalação dos implantes e indução da periimplantite

Após dois meses de período cicatricial inicial. Os procedimentos de sedação e anestesia foram repetidos (conforme a primeira fase cirúrgica) e incisões horizontais sobre a crista dos rebordos foram realizadas estendendo-se da distal do canino à região mesial do segundo molar, seguida da elevação de um retalho mucoperiosteal (figura 4a).

Quatro implantes de 3.3 X 10.0 mm (Bone Level TML SLA, Straumann, Basel-Switzerland) foram instalados ao nível da crista óssea em cada hemi-mandíbula de cada animal, totalizando 64 implantes. Estes implantes foram instalados a uma distância de 7,0 mm entre cada um deles (figura 4b e 4c). Após o posicionamento dos implantes em fase única (foram instalados os cicatrizadores no momento inicial) os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 5.0 (Ethicon, São Jose dos Campos, Brasil) (figura 4d). Nos cuidados pós-operatórios, cloridato de tramadol (50mg/ml) foi usado na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica.

Figura 4. Instalação dos implantes. a) Retalho aberto com rebordo regularizado; b) Distância interimplantar após última fresa; c) Paralelismo entre os implantes; d) Aspecto final, cirurgia em fase única.

Após um período de 2 meses, ligaduras com fio de seda 3-0 foram instaladas, com 4 nós e 4 voltas completas ao redor dos cicatrizadores (figura 5a). Uma dieta pastosa foi instituída para maior acúmulo de placa. As ligaduras foram verificadas semanalmente para que em casos de perda houvesse uma imediata substituição. A peri-implantite experimental foi induzida por 8 semanas e verificada por análises clínicas e radiográficas no ato da instalação dos implantes, durante e ao término do período da indução da doença (no tratamento). Após este período, as ligaduras foram removidas (figura 5d) e a periimplantite instalada permaneceu por mais 4 semanas para a permissão do acúmulo do biofilme bacteriano e efetivação do quadro crônico da doença (Persson et al., 2001; Sennerby et al., 2005).

3.4 Terceira Fase Cirúrgica: tratamento da periimplantite induzida

Os procedimentos de sedação e anestesia foram repetidos (conforme a primeira fase cirúrgica). O acesso cirúrgico foi feito com incisões intrassulculares e crestais estendendo-se da distal do canino à região mesial do segundo molar (figura 5b). Após a elevação dos retalhos mucoperiosteais a remoção de tecido granulomatoso foi realizada cuidadosamente com curetas de titânio (Wingroove™ Paradise Dental Technologies, Missoula, MT, EUA) (figura 5e), e descontaminação da superfície dos implantes através da remoção de biofilme bacteriano com bolinhas de algodão estéreis embebidas em soro com o auxílio de curetas de teflon (Implacare-IMPHDL6, Hu-friedy Mfg Co Inc., Chicago, IL, EUA) (figura 5c).

Figura 5.Indução da doença e tratamento mecânico. a) Aspecto da colocação da ligadura; b) aspecto encontrado após abertura do retalho para acesso; c) cureta de teflon utilizada para debridamento mecânico dos implantes; d) aspecto da lesão imediatamente antes da remoção das ligaduras e tratamento; e) curetas de titânio utilizadas na remoção do tecido de granulação.

Estes procedimentos foram realizados em ambos lados da mandíbula e, em seguida, os seguintes tratamentos foram aplicados através do método de aleatorização cross-location:

De um lado da mandíbula, as superfícies dos implantes foram condicionadas com cloridrato de tetraciclina (HCL) na dosagem de 50mg/ml aplicada por 3 minutos com bolinhas de algodão estéreis (figura 6a), substituídas a cada 30 segundos (6 bolinhas no total). Após a aplicação da tetraciclina (figura 6b), dois implantes (TTC+ROG) receberam regeneração óssea guiada (ROG) com biomaterial xenógeno bovino (Geistlich Bio-Oss®) no interior dos defeitos (figura 6d), cobertos com membrana colágena suína (Geistlich Bio-Gide®) (figura 6c). Dois implantes permaneceram sem a associação com biomaterial (TTC). Em seguida os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de sutura absorvível 5-0 (Vycril, Ethicon, São Jose dos Campos, Brasil) de forma a manter os implantes submersos.

Do lado oposto da mandíbula, foi realizada a terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando-se de um *laser* de diodo de mão de comprimento de onda vermelho (660nm), com potência de 0.06 W/cm² por 60 segundos e fluência de 212.23 J/cm² (HELBO minilaser 2075 F dent, HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) associado a um corante fotossensibilizador a base de cloreto de fenotiazina (HELBO Blue Photosensitizer®, HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Áustria). O fotossensibilizador foi aplicado do fundo para a cervical do defeito, em toda a circunferência do implante. Um tempo pré-irradiação (TPI) de 5 minutos foi respeitado e, em seguida, a superfície do implante foi lavada com soro fisiológico para a remoção dos excessos de sensibilizador (figura 7a). A irradiação foi realizada por meio de uma ponta de fibra óptica flexível com uma curva de 60 graus, 8,5 mm de comprimento e 0,06 mm de diâmetro. Assim, a superfície do implante foi dividida em mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual, mesio-lingual, e superfície interna. O *laser* foi aplicado por 30 segundos em cada região, totalizando 210 segundos por implante, com uma dose de 51 J/cm². Em seguida, dois implantes (TFA+ROG) receberam regeneração óssea guiada (ROG) com biomaterial xenógeno bovino (Geistlich Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) no interior dos defeitos (figura 7b), cobertos com membrana colágena suína (Geistlich Bio-Gide®, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) (figura 7c). Dois implantes permaneceram sem ROG (TFA). Posteriormente, os retalhos foram reposicionados e suturados, deixando os implantes submersos.

Após a realização dos tratamentos, os implantes foram divididos em 4 grupos:

- Grupo TTC: implantes somente com a aplicação do cloridrato de tetraciclina.
- Grupo TTC+ROG: implantes com a aplicação do cloridrato de tetraciclina e ROG.

- Grupo TFA: implantes somente com a aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA).
- Grupo TFA+ROG: implantes com a aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) e a associação com ROG.

Nos cuidados pós-operatórios, foram utilizados cloridato de tramadol (50mg/ml) na dosagem de 3mg/kg no intervalo 12 horas como terapia analgésica, e cetoprofeno 20mg na dosagem de 1 comprimido/20 kg como anti-inflamatório. Nenhuma medicação antibiótica foi administrada nesta fase. A dieta leve foi mantida por 15 dias, e a cicatrização foi acompanhada periodicamente. Os dentes remanescentes receberam controle de placa.

Figura 6. Tratamento com Cloridrato de tetraciclina 50mg/ml. a) Aspecto da solução imediatamente após preparada; b) aspecto dos implantes após a aplicação da TTC; c) Aspecto cirúrgico após a colocação da membrana colágena; d) Aspecto da área após a colocação da hidroxiapatita bovina.

Figura 7. Tratamento com a TFA. a) Aspecto após a irrigação com soro fisiológico, imediatamente antes da irradiação; b) Hidroxiapatita bovina posicionada; c) Membrana colágena posicionada.

Figura 8. Coleta microbiológica e acondicionamento em tubos Eppendorf contendo 0,15 ml de solução tampão TE.

As coletas microbiológicas foram realizadas anteriormente a terapia mecânica, após a terapia mecânica, e após o tratamento adjunto, com a utilização de *swab* com “*microbrushes*” estéreis, um implante por grupo, e acondicionados em tubos Eppendorf (figura 8) contendo 0,15 ml de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6).

3.5 Eutanásia e Processamento Histológico

Doze semanas após o tratamento, os animais foram sedados e eutanasiados por um aprofundamento anestésico profundo e subsequente overdose de thiopental sódico (Thiopentax, Cristália, Brasil), seguida de injeção endovenosa de cloreto de potássio. As hemi-mandíbulas foram dissecadas, removidas, e fixadas em formalina a 4% em pH 7 por dez dias.

3.6 Forma de análise dos resultados

3.6.1 Técnica de Checkerboard DNA-DNA Hybridization

A cada tubo de Eppendorf, contendo a amostra de placa bacteriana coletada, recebeu 0,15ml de 0.5 M NaOH. As suspensões foram fervidas em banho-maria por 5 min e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 ml de 5 M de acetato de amônia. Ao fim deste processo as células bacterianas se encontram lisadas e o DNA suspenso na solução. Cada suspensão de placa contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “*Minislot*” (Immunetics, Cambridge, MA, USA) e o DNA concentrado na membrana de nylon (15 X 15 cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA). A membrana foi removida do aparato e o DNA depositado, então fixado na mesma por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. As duas últimas canaletas do “*Minislot*” abrigaram os controles, contendo uma mistura das espécies de microorganismos investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas (Haffajee et al., 1997).

3.6.1.1 Hibridização das membranas com as sondas de DNA

Após fixação do DNA, as membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 hora numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0.5 mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “*Miniblotter 45*” (Immunetics, Cambridge, MA, USA) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às 45 canaletas do “*Miniblotter*”.

3.6.1.2 Sondas de DNA

As sondas de DNA, específicas para 36 espécies, foram confeccionadas usando o “random primer digoxigenin labeling Kit” (Boehringer Mannheim), como descrito por (Feinberg and Vogelstein, 1983). Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação com diferentes tipos de doenças e saúde periimplantar (Shibli et al., 2008) e estão listadas na tabela 1. Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 de células bacterianas. As concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas se assemelhassem. Cada canaleta do “Miniblotter 45” recebeu 130 µl de uma determinada sonda, contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6.5), 0.2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/ml de sonda de DNA). A hibridização foi feita perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato de xadrez com as linhas de DNA, horizontais, e as sondas, verticais. O aparato, contendo as membranas, foi acondicionado em um saco plástico para evitar a desidratação. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu a 42°C, durante um período mínimo de 20 horas.

3.6.1.3 Detecção das espécies

Após hibridização, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 minutos, a 65°C, numa solução adstringente (0.1 X SSC, 0.1% SDS), para remoção das sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora numa solução contendo 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0, e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenin conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), numa diluição de 1/25.000 (Engler-Blum et al., 1993), seguido de lavagem das membranas com uma solução de 0.1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0.2 M NaOH, 0.3% Tween 20, pH 8.0, 2 vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0.1 M Tris HCl, 0.1 Na Cl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5. As membranas foram então incubadas em uma solução detectora, Lumi Phos 530 (Lumigen, Southfield, MI, USA), por 45 minutos a 37°C, e colocadas num cassete sob um filme radiográfico (KodaK X-OMAT) por aproximadamente 40 minutos, para posterior revelação.

Tabela 1. Espécies bacterianas utilizadas e as respectivas cepas.

Espécie	Cepa
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104*
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823*
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277*
<i>A. actinomycetencomytans</i> (a+b)	43718* + 29523*
<i>F.n. (sp. vincentii)</i>	49256*
<i>Campylobacter rectus</i>	33238*
<i>Treponema Socranskii</i>	S1¶
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271*
* <i>Parvimonas micra</i>	33270*
<i>Veillonella parvula</i>	10790*
<i>Actinomyces oris</i>	43146*
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397*
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556*
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860*
<i>Streptococcus oralis</i>	35037*
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596*
<i>Actinomyces israeli</i>	12102*
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335*
<i>Treponema denticola</i>	B1¶
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563*
<i>Actinomyces odontolyticus</i> I	17929*
<i>F.n. (sp. polymorphum)</i>	10953*
<i>Campylobacter showae</i>	51146**
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693*
<i>Neisseria mucosa</i>	19696*
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (sp. nucleatum)	25586*
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624*
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558*
<i>Tannerella forsythia</i>	43037*
<i>Selenomonas noxia</i>	43541*
<i>Propionibacterium acnes</i> (I + II)	11827* + 11828*
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845*
<i>Streptococcus mitis</i>	49456*
<i>Eikenella corrodens</i>	23834*
<i>Gemella morbillorum</i>	27824*
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612*
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201*
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236*
<i>Prevotella intermedia</i>	25611*

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma:

Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número 0 indicou que não houve detecção do sinal; 1 que houve detecção de um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2, um sinal equivalente a 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 a 10^6 células e 5, mais de 10^6 células. Estes registros foram

utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas de forma semi-quantitativa.

3.6.1.4 Análise Estatística

Testes não paramétricos foram utilizados. As medianas e os 25 e 75 percentis foram calculados e descritos para contagem bacteriana antes, e após os tratamentos. As reduções das contagens (delta) foram também comparadas entre os grupos. O teste de Mann-Whitney para duas amostras foi utilizado para análise inter-grupo, e Wilcoxon para análises intra-grupo. O animal foi considerado a unidade experimental de análise, e o valor de p de 5%. As comparações foram consideradas estatisticamente significantes se o p calculado foi < 0.00125 para ajuste de comparações múltiplas ($0.05/40$ espécies).

3.6.2 Histomorfometria

Após a realização da microtomografia, os espécimes foram transferidos para uma solução de 70% álcool e, então, desidratados de forma ascendente, até atingir a concentração de 100%. Em seguida, foram infiltrados e incluídos em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, England).

Após a inclusão em resina, os implantes foram seccionados no sentido vestibulo-lingual e mesio-distal pela técnica de secção de tecidos duros (Donath and Breuner, 1982). Assim, metade dos implantes de cada grupo foram seccionados vestibulo-lingualmente, e metade mesio-distalmente. As lâminas foram preparadas com uma espessura média de 50 a 80µm para análise histomorfométrica após serem coradas com *Stevenel's blue* e *Vermelho de Alizarina*.

Secções histológicas longitudinais quadro a quadro, em aumento de 4x de cada implante foram capturadas através de uma câmara de vídeo (DP73, Olympus America) acoplada a um microscópio automatizado (BX51, Olympus America). As imagens foram analisadas em um programa (cellSens® Dimension 1.11 Digital Imaging Software, Olympus America) através de um examinador sem conhecimento dos grupos experimentais. Todas as medidas foram realizadas nas faces vestibulares e linguais dos cortes vestibulo-linguais, e mesiais e distais dos cortes mesio-distais dos implantes.

As medidas realizadas foram:

- Distância linear vertical (mm) entre o ombro do implante e o fundo do defeito, determinada de acordo com o defeito ósseo detectado através de diferenciação entre o osso neoformado e o osso antigo residente por três examinadores em acordo (OFD).
- Distância linear da crista (mm) entre ombro do implante e o rebordo alveolar na região cervical (OC).
- Contato osso-implante (%BIC) partindo do ombro do implante até uma extremidade final (determinada de acordo com o defeito ósseo detectado através de diferenciação entre o osso neoformado e o osso antigo residente por três examinadores em acordo) razão entre a superfície total do defeito e a superfície do implante em contato com o osso.
- Distância linear vertical (mm) medida a partir do ombro do implante em direção ao primeiro contato entre o osso mineralizado e a superfície do implante (OO).
- Preenchimento ósseo (mm) calculado como a subtração: OFD – OO.
- Contato osso-implante de osso regenerado (%BIC) partindo do primeiro contato osso-implante até uma extremidade final (determinada de acordo com o defeito ósseo detectado através de diferenciação entre o osso neoformado e o osso antigo residente por três examinadores em acordo) razão entre a superfície total do defeito regenerado e a superfície do implante em contato com o osso.

3.6.2.1 Análise estatística

Teste ANOVA de análises repetidas foi realizado para comparação entre os desfechos de tratamento e características dos defeitos. As medidas a nível de implante foram agregadas a nível de animal, sendo o animal utilizado com unidade experimental. Equações estimativas gerais foram utilizadas para o estudo da relação entre os desfechos de tratamento (defeito residual, ganho ósseo, e BIC no osso novo) e variáveis explanatórias (TTC/TFA, ROG, sítio, localização, e exposição do implante). Medidas a nível de implante foram utilizadas e estimativas foram ajustadas para o agrupamento de observações por animal. Uma correlação cambiável e uma estimativa de variância robusta foram utilizadas. Teste de Wald para comparações múltiplas e o nível de significância ajustado para 5%

4 RESULTADOS

4.1 Histomofometria

Onze dos 55 implantes (20%) foram diagnosticados com exposições ao meio bucal. As exposições foram distribuídas de forma similar pelos grupos (TFA: 2; T^oTTC: 3; TFA+ROG: 4; T^oTTC+ROG: 2). Cinco dos 55 implantes (9%) apresentaram inflamação localizada, sendo 3 implantes tratados com T^oTTC e 2 com TFA+ROG. Vinte e um (75%) dos 28 implantes que receberam ROG exibiram OBM, representando 13 sítios recebendo TFA +ROG e 8 sítios recebendo T^oTTC+ROG. Todos os sítios exibindo OBM apresentaram partículas encasuladas em tecido conjuntivo, sem indicação de formação óssea (figura 8 setas verdes). Nenhum dos sítios demonstraram evidência de degradação do OBM (bordas irregulares, células com morfologia osteoclástica, ou erosão de biomateriais). Seis sítios que receberam TFA+ROG e 6 que receberam T^oTTC+ROG exibiram OBM embebido em osso (figura 8 setas amarelas), sem apresentar sinais de atividade metabólica ou reabsorção. Nenhuma partícula de OBM foi encontrada em contato direto com a superfície do implante.

4.1.1 Características dos defeitos

Os grupos experimentais não apresentaram diferenças no que tange as características dos defeitos (tabela 2). A média dos defeitos histológicos e clínicos variou entre 2.28 ± 0.75 a 3.03 ± 1.22 mm, and 1.81 ± 0.50 a 2.56 ± 0.89 mm, respectivamente. O nível da crista óssea apresentou valores entre 0.89 ± 0.90 a 1.28 ± 0.86 .

4.1.2 Desfecho do tratamento

Não foram observadas diferenças significantes entre os tratamentos para a formação de novo osso nem a re-osseointegração, representada pela %BIC do novo osso formado (tabela 2). O ganho ósseo variou entre 1.00 ± 0.61 a 1.23 ± 0.57 em milímetros, e 46.88 a 53.11% em proporção, demonstrando uma resolução limitada dos defeitos, independentemente do tipo de desinfecção e uso ou não da ROG com OBM/membrane colágena. A re-osseointegração teve variação entre 59.20 e 68.53% (figura 9).

Os preditores para ganho ósseo, e BIC estão apresentados na tabela 3. Não houve efeito significativo para o ganho ósseo e re-osseointegração quando as variáveis tratamento e ROG foram analisadas, após o ajuste dos co-fatores no modelo estatístico. Sítios proximais e linguais

apresentaram maiores ganho ósseo que vestibulares. Implantes localizados em áreas posteriores (P4 e M1) apresentaram melhores resultados quanto ao ganho ósseo e a exposição pós cirúrgica teve efeito negativo no ganho de osso novo.

Figura 8. Partículas de biomaterial envolvidas por tecido fibroso (setas verdes) e tecido ósseo (seta amarela).

Figura 9. Imagens dos cortes histológicos no sentido Mesio- distal (M-D) e Vestibulo-lingual (V-L); a) TFA+ROG V-L; b) TTC+ROG V-L; c) TFA+ROG M-D; d) TTC+ROG M-D; e) TFA V-L; f)TTC V-L; g) TFA M-D; h) TTC M-D.

Tabela 2. Características dos defeito pré-tratamento, e após o tratamento, com Tetraciclina (TTC) ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) com ou sem regeneração óssea guiada (ROG) (n= 8 animais; médias $\pm$ DP em mm).

	TTC	TFA	TTC+ROG	TFA+ROG	<i>p</i>
Características do defeito					
Altura do defeito clínico	1.81 $\pm$ 0.50	2.00 $\pm$ 0.76	2.13 $\pm$ 0.46	2.56 $\pm$ 0.89	0.06
Altura clínica da crista óssea	0.89 $\pm$ 0.90	0.91 $\pm$ 0.68	1.34 $\pm$ 0.89	1.28 $\pm$ 0.86	0.12
Altura do defeito histológico	2.32 $\pm$ 0.92	2.28 $\pm$ 0.75	2.45 $\pm$ 0.54	3.03 $\pm$ 1.22	0.13
Desfechos do tratamento					
Defeito residual					
Altura total do defeito	0.80 $\pm$ 1.18	0.46 $\pm$ 0.78	0.81 $\pm$ 1.34	0.75 $\pm$ 1.62	0.41
Nível da crista óssea	1.32 $\pm$ 1.35	1.28 $\pm$ 0.98	1.36 $\pm$ 1.00	1.84 $\pm$ 1.52	0.85
Ganho ósseo					
Ganho ósseo linear (mm)	1.01 $\pm$ 0.54	1.00 $\pm$ 0.61	1.12 $\pm$ 0.53	1.23 $\pm$ 0.57	0.56
Porcentagem de ganho ósseo	53.11 $\pm$ 36.63	46.88 $\pm$ 26.86	49.93 $\pm$ 28.95	47.32 $\pm$ 28.54	0.89
BIC (%)					
Total	36.23 $\pm$ 21.89	35.49 $\pm$ 17.18	36.27 $\pm$ 21.28	27.57 $\pm$ 15.25	0.56
Infra-ósseo	51.72 $\pm$ 22.23	52.15 $\pm$ 22.51	60.81 $\pm$ 16.58	45.61 $\pm$ 12.63	0.45
Novo osso	61.88 $\pm$ 21.49	60.98 $\pm$ 22.44	68.53 $\pm$ 22.22	59.20 $\pm$ 11.80	0.74

Tabela 3. Variáveis preditoras para formação de osso novo e contato osso implante (BIC) após terapia anti-infecciosa (AIT) com ou sem regeneração óssea guiada (ROG).

		Defeito residual total				Ganho osseo linear (mm)				BIC osso novo (%)			
		Coef	95%CI		<i>p</i>	Coef	95%CI		<i>p</i>	Coef	95%CI		<i>p</i>
TAI	Não	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Sim	0.06	-0.39	0.50	0.79	0.06	-0.15	0.27	0.59	0.00	-0.06	0.07	0.89
ROG	Não	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Sim	0.36	-0.18	0.89	0.19	0.21	0.00	0.42	0.05	0.00	-0.12	0.12	0.98
Sítio	Bucal	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Lingual	-1.39	-2.10	-0.68	>0.001	0.38	0.15	0.61	0.001	0.04	-0.08	0.16	0.55
	Mesial	-0.91	-1.40	-0.42	>0.001	0.30	0.15	0.46	>0.001	-0.04	-0.23	0.15	0.68
	Distal	-0.91	-1.39	-0.43	>0.001	0.48	0.26	0.69	>0.001	-0.02	-0.16	0.12	0.76
Localização	Anterior	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Posterior	-0.19	-0.46	0.09	0.18	0.24	0.08	0.41	0.004	0.01	-0.11	0.14	0.85
Exposição	Não	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Sim	1.67	1.12	2.22	>0.001	-0.59	-0.77	-0.42	>0.001	-0.28	-0.48	-0.08	0.006

(n=8 animais e 55 implantes).

Figura 10. Níveis iniciais e finais dos complexos bacterianos por tratamento (*) representa diferenças significantes ($p < 0.05$) na comparação inter-grupos.

4.2 Microbiologia

Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos no tempo 0 (t0) em relação as porcentagens individuais de bactérias. Ambos grupos apresentaram predominância de bactérias dos complexos vermelho e laranja (TFA: 11% e TTC: 16%; TFA: 38% e TTC: 40%, respectivamente) e proporções inferiores a 1% para *A. Actinomycetencomitans* no momento da fase de tratamento (figura 11). As reduções de carga bacteriana total foram nos dois grupos tratados (figura 10). Na comparação intra-grupo, a TTC apresentou diferenças significantes apenas para *A. oris*, quando comparada ao t0. A TFA demonstrou diferenças significantes nas bactérias *A. naeslundii*, *S. constellatus*, *E. nodatum*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *T. socranskii*, *S. sanguinis*, *A. odontolyticus* e *C. sputigena*, quando os níveis absolutos foram considerados. Apesar de apresentar níveis mais baixos em todas as bactérias ao final do tratamento, o grupo TFA não alcançou diferenças significantes.

Ambos tratamentos foram capazes de reduzir o número de bactérias coletadas na superfície dos implantes (figura 13); houve reduções significantes de bactérias do complexo vermelho e laranja após o tratamento. Quando comparadas as contagens totais de cada uma das 40 bactérias analisadas, não houve diferenças significantes entre os grupos em t0. As reduções nas contagens das bactérias foram maiores para o grupo TFA quando comparada ao grupo TTC, porém, após o ajuste para análises múltiplas, não houve diferença significativa (tabela 4).

O grupo TFA apresentou menores níveis percentuais de bactérias do complexo vermelho após o tratamento, embora sem diferenças estatísticas significantes. Notou-se também um aumento das porcentagens de bactérias do complexo laranja, com níveis finais maiores, embora sem significância estatística, que o grupo TTC. A redução do complexo vermelho no grupo TFA foi também acompanhada pelo ligeiro aumento da percentagem de bactérias do complexo amarelo, e redução do complexo verde, também sem diferença entre os grupos (figura 12).

Figura 11. Percentagens iniciais de bactérias por grupo. Predominância de bactérias dos complexos vermelho e laranja.

Figura 12. Percentagens finais, após o tratamento, de ambos os grupos.

Tabela 4. Redução das espécies subgingivais após o tratamento. Mediana, 25 e 75 percentis de contagem bacteriana X 1.000. (n=6)

	TTC				TFA				
	Mediana	25%	75%	p antes vs. depois*	Median	25%	75%	p antes vs. depois*	p TTC vs. TFA*
T Socranskii	5	0	90	0,33	55	0	100	0,05	0,16
E Saburreum	5	0	500	0,45	450	0	1000	0,19	0,28
S anginosus	10	0	400	0,34	250	0	500	0,05	0,43
N mucosa	500	0	9500	0,52	5400	0	10000	0,09	0,29
S noxia	0	0	490	0,57	500	0	500	0,046	0,33
P acnes	0	0	10	0,56	5	0	10	0,08	0,32
G morbillorum	250	0	990	0,19	295	0	500	0,09	0,75
L buccalis	50	-100	900	0,53	995	100	10000	0,035	0,46
C gracilis	5	0	90	0,52	50	-90	400	0,34	0,53
P intermedia	450	0	900	0,17	495	0	990	0,09	0,83
P melaninogenica	5	0	500	0,52	500	10	900	0,07	0,43
F. Nuc. Ss polymorphism	255	0	9000	0,21	1000	10	9900	0,035	0,19
C showae	5	0	10	0,45	255	0	990	0,05	0,66
F periodonticum	200	0	500	0,39	495	0	1000	0,05	0,2
F. nucleatum ss nucleatum	55	0	900	0,29	740	10	1000	0,06	0,12
F.n.(sp vicentii)	0	0	500	0,73	4995	10	9990	0,06	0,21
C. rectus	10	0	490	0,34	255	0	500	0,05	0,49
P micra	50	0	1000	0,38	300	0	1000	0,05	0,49
S Constellatus	50	0	500	0,38	55	0	500	0,05	0,67
E nodatum	0	0	490	0,57	750	0	1000	0,05	0,2
T denticola	500	0	500	0,09	500	0	990	0,05	0,49
P gingivalis	5	0	9900	0,28	750	0	1000	0,05	0,67
T forsythia	495	0	1000	0,33	1000	0	1000	0,05	0,67
A naeslundii I	0	0	100	0,57	55	0	1000	0,05	0,16
A Oris	500	0	900	0,14	650	-10	1000	0,12	0,83
A gerencseriae	500	0	500	0,29	1000	0	1000	0,046	0,28
A israelii	250	0	500	0,51	255	0	500	0,05	0,9
C ochracea	290	0	1000	0,2	740	0	1000	0,05	0,73
C gingivalis	0	-10	400	0,99	740	0	1000	0,09	0,09
E corrodens	0	0	490	0,57	250	0	500	0,08	0,57
C sputigena	500	0	9500	0,2	1000	0	10000	0,05	0,25
S mitis	200	0	500	0,28	400	0	500	0,09	0,39
S gordonii	0	0	400	0,57	500	0	990	0,05	0,09
S sanguis	500	0	500	0,29	1000	0	1000	0,046	0,28
S oralis	5	0	100	0,45	250	0	500	0,08	0,43
S intermedius	10	0	490	0,34	300	0	500	0,05	0,23
V parvula	0	0	500	0,65	500	0	1000	0,05	0,09
A odontolyticus	55	0	900	0,34	500	0	1000	0,05	0,53
A actinomycetomitans	0	0	100	0,56	50	0	100	0,08	0,32

* Wilcoxon signed-rank test

Figura 13. Contagem bacteriana antes e depois do tratamento.

5 DISCUSSÃO

5.1 Modelo experimental: limitações e possibilidades

5.1.1 Histomorfometria

O uso do modelo experimental para doença periimplantar induzida em cães é bem estabelecido na literatura (Ericsson et al., 1996, Fickl et al., 2015, Martins et al., 2005, Park et al., 2015, Schou et al., 2003, Schwarz et al., 2006b, Warrer et al., 1995, You et al., 2007). Um inconveniente deste modelo para avaliação do tratamento, apesar da semelhança com defeitos periimplantares em humanos (Schwarz et al., 2007), é a falta de padronização dos defeitos, principal característica de outros modelos de regeneração óssea (Bosch et al., 1998).

Recentemente, foi proposta uma classificação dos defeitos considerando o número de paredes apresentando componentes supra e infra-ósseos (Schwarz et al., 2007). Segundo esta classificação, defeitos circunferenciais contidos demonstraram maior capacidade de regeneração que defeitos apresentando perdas ósseas horizontais (Schwarz et al., 2010), seguindo os mesmos preceitos biológicos de necessidade de fonte celular para regeneração periodontal (Susin et al., 2015). Neste ponto, as faces vestibulares tendem a apresentar deiscências ósseas mais frequentes que faces linguais e proximais, menor ganho ósseo frente a terapia como demonstraram os resultados (tabela 5).

Apenas um estudo pré-clínico apresentou a caracterização dos defeitos segundo esta classificação, sem a divisão de análises por faces (Schwarz et al., 2011b). O presente estudo demonstrou uma maior ocorrência de defeitos tipo deiscência, com ausência de paredes na superfície vestibular dos implantes. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos entre os defeitos no período inicial do estudo.

Somado a isso, há uma limitação para se determinar precisamente a extensão do defeito ósseo causado pela indução e progressão da doença. O uso da coloração histológica como forma de identificar osso remodelado e osso residente com ou sem a utilização de fluorocromo é amplamente descrita na literatura (Wetzel et al., 1999, Shibli et al., 2006, Schwarz et al., 2011b, Namgoong et al., 2015). O presente estudo utilizou da diferença entre as colorações histológicas, associadas ao uso de luz polarizada para melhor análise do padrão de fibras colágenas, e com a concordância de três examinadores para determinar o fundo do defeito histológico.

5.1.2 Microbiologia

A avaliação do efeito da desinfecção em superfície de implante deste estudo foi realizada por meio do método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard*. Na literatura, poucos estudos avaliaram os desfechos microbiológicos da descontaminação de implantes, sendo essas avaliações geralmente feitas por meio de contagem de colônias cultivadas (Shibli et al., 2003a, Nociti et al., 2001a). A técnica *Checkerboard* possui inúmeras vantagens frente a cultura e contagem de colônia; dentre elas, destacam-se a possibilidade de análise de vários microorganismos (até 40) em uma só amostra e processo, tornando-se uma técnica menos laboriosa e de menor consumo de tempo.

Um estudo anterior avaliou com sucesso a microbiota canina por meio da técnica *Checkerboard*, alcançando detecções de todas as espécies em todas as superfícies testadas, tendo como conclusão que o modelo canino tem relevância para a avaliação de intervenções potenciais em seres humanos (Rober et al., 2008). Apesar das sondas para a técnica de hibridização DNA-DNA utilizadas tenham sido desenhadas originalmente para cepas comuns à microbiota humana, elas foram capazes de detectar algumas das bactérias da flora oral dos cães, possivelmente devido a reações cruzadas com bactérias de mesmo gênero, o que fez nossa análise possível. No entanto, estudos futuros devem se utilizar de sondas de DNA desenhadas especificamente para a flora oral canina (Dahlen et al., 2012).

Tabela 5. Resumo dos estudos anteriores que se utilizaram de métodos de tratamento/metodologia semelhantes ao presente estudo

	Método de Indução	Tratamentos	Defeitos Iniciais	Preenchimento ósseo	Eutanásia	BIC
Shibli 2006 n=5	3 meses L+ 2 meses L-	aPDT + GBR with ePTFE: 985nm; 80 segundos; 4j; 4J/cm ² método do escaneamento, 20 segundos por sítio Debridamento	2.43 a 4.55mm	1.75 a 2mm 42 a 66%	5 meses	1 COI-FD 31-41% 0-14%
Schwarz 2011 n= 6	4 meses L+ 1 mês L-	Defeitos infraósseos preenchidos c/ OBM: Componente Supracrestal com: Bloco equino Implantoplastia Bloco equino +rh-BMP-2 Implantoplastia +rh-BMP-2	3.9 a 5.1mm	13 a 31%	3 meses	OI-FD 19% 15% 28% 32%
Shibli 2003 n=5	2 meses L+ 12 meses L-	TFA+ROG c/ Membrana de ePTFE TBO 100µg/ml λ=685nm por 80 segs (20 segundos por face) 4J; 200J/cm ² , ponta colimada de 2mm.	3.26 a 5.86	26 a 48%	5 meses	1º COI-BD 15-25%
Wetzell 1999 n=7	4 meses L+	Clorexidina + ROG	2.7 a 3.11 mm	60 a 80%	18 meses	1BIC-BD 2-20%
Nociti Jr. 2001 n= 5	6 meses L+ 2 meses L-	Metronidazol sistêmico ROG c/ OBM Membrana colágena ROG c/ OBM Membrana de ePTFE	-	-	5 meses	6 1 ^{as} roscas 27% 25%
Carcuac 2015 n=6	9 semanas L+ 2 meses L-	Solução salina ou clorexidina	3.57 a 3.73 (medido por Rx)	-	6 meses	-
Nociti Jr. 2000 N=5	1 mês L+ 2 semanas L-	Debridamento Debridamento + Membrana colágena Debridamento + OBM Debridamento + OBM e Membrana colágena	-	-	5 meses	26,86% 26,67% 28,12% 25,62%
Ericsson et al., 1996 n=5	6 a 8 semanas L+ 4 semanas L-	Amoxicilina e metronidazol	-	-	4 meses	-
Parlar 2009 n=9	Ligaduras (sem tempo estabelecido)	<i>Spray</i> Salino+ Membrana colágena	4 mm	4.1 a 3.7mm	3 meses	62%

As limitações deste estudo estão relacionadas ao modelo experimental utilizado para indução de defeitos periimplantares com características próximas às encontradas clinicamente em humanos. No entanto, este é o modelo mais aceito e utilizado para avaliar a resposta biológica ao tratamento da periimplantite. Modelos experimentais alternativos e padronizados devem ser criados e validados para estudos futuros, de modo a contornar as limitações do modelo atual.

5.2 Ganho ósseo vertical e re-osseointegração

Inúmeros métodos foram propostos para a desinfecção da superfície do implante e tratamento cirúrgico da periimplantite (tabela 3). No entanto, poucos estudos avaliaram o uso da TFA. Shibli et al. (2006) compararam o efeito da TFA no debridamento cirúrgico e ROG com membranas não absorvíveis em 4 diferentes superfícies de implantes, demonstrando melhores taxas de re-osseointegração. No entanto, comparações diretas com o presente estudo devem ser feitas com precaução. Mesmo que ambos estudos tenham se utilizado da TFA como descontaminante local, a terapia foi realizada com tempo, pré-irradiação, fotossensibilizador, concentração de fotossensibilizador, e parâmetros luminosos (Shibli et al., 2003b, Shibli et al., 2006).

A TFA se caracteriza por um tratamento localizado, que tem sua ação dependente da irradiação luminosa, ou fotoativação. Estudos pré-clínicos demonstram que aumentando-se a concentração do fotossensibilizador e dose luminosa/fluência (Qin et al., 2008a). Este estudo utilizou um tempo de pré-irradiação de 5 minutos, que tem demonstrado ser o tempo ótimo para a sensibilização de bactérias patogênicas (Qin et al., 2008a, Qin et al., 2008b). Em se tratando de tratamento periodontal não cirúrgico, o uso de múltiplas aplicações por um tempo de 10 segundos tem demonstrado melhores resultados que a aplicação única (Lulic et al., 2009, Moreira et al., 2015, Ramos et al., 2015). Este estudo no entanto utilizou-se de uma abordagem cirúrgica, razão pela qual o tempo de irradiação foi estendido.

Poucos estudos avaliaram o efeito de diferentes biomateriais no sucesso da ROG. Neste estudo, a utilização da regeneração óssea guiada não apresentou efeitos suplementares à descontaminação. Schwarz et al. (2011b) compararam os efeitos do OBM associado a um bloco equino embebido em rhBMP-2 na regeneração de defeitos periimplantares, não observando diferenças entre as diferentes combinações de tratamento, com preenchimento ósseo limitado, de 13 a 31%. Os resultados obtidos pelo presente estudo foram melhores, porém comparações diretas devem ser realizadas com cautela por se tratar de superfícies de implante diferentes, e protocolos de descontaminação também diferentes. Nociti et al. (2000) compararam uso do

OBM com ou sem o uso de membrana colágena, associado a desinfecção com clorexidina 0.12%, sem encontrar diferenças significativas. Quando comparada ao uso de membrana não absorvível, a membrana colágena também não demonstrou diferenças (Nociti et al., 2001b).

O contato osso implante mostra a re-osseointegração obtida pelo tratamento e pode ser considerado um desfecho sobre a qualidade do ganho ósseo. Apesar de alguns defeitos demonstrarem sucesso parcial/total, a porcentagem de BIC alcançada quando a superfície total do implante foi considerada 27.57 a 36.27%. Quando analisado apenas o osso regenerado, as taxas de BIC foram de 59.20 a 68.53%. Um estudo prévio utilizando TFA, com parâmetros diferentes do presente estudo, em associação a uma barreira não absorvível reportou BIC de 15 a 42% (Shibli et al., 2003b, Shibli et al., 2006). Resultados semelhantes ao alcançado com o uso barreiras absorvíveis/não absorvíveis e desinfecção tópica com clorexidina e com ou sem o uso de metronidazol sistêmico (Wetzel et al., 1999, Namgoong et al., 2015). Quando da utilização do OBM e membrana colágena, o BIC foi de 25% (Nociti et al., 2000, Nociti et al., 2001b), no entanto, comparações diretas devem ser feitas com cuidado devido as diferenças de macro/micro estruturas dos implantes.

O preenchimento linear do defeito variou entre 1.01 e 1.23mm, sem diferenças entre os tratamentos. Estes resultados foram maiores que os encontrados quando apenas a membrana colágena foi utilizada (Namgoong et al., 2015) e menores que estudos apresentando defeitos ósseo mais profundos no t0 (Shibli et al., 2006, Wetzel et al., 1999).

A associação de membrana colágena e OBM não apresentou efeitos suplementares em termos de formação óssea em altura e qualidade. Uma dificuldade frequente foi a padronização dos defeitos devido a progressão espontânea, característica do modelo experimental e limitação do mesmo.

5.3 Redução da microbiota

As proporções de bactérias dos complexos vermelho e laranja encontradas no presente estudo se assemelham às reportadas em estudos anteriores (17,2% e 46%) em amostras colhidas de implantes em humanos (Shibli et al., 2008). Estes dados reforçam a premissa de que o modelo animal de periimplantite induzida promove de forma efetiva uma infecção crônica com características parecidas com as encontradas em humanos (Rober et al., 2008).

Apesar de os resultados terem demonstrado uma maior tendência de redução da microbiota em favor da TFA, diferenças estatísticas não foram detectadas, provavelmente pela limitação do número de amostras coletadas, esta é uma das limitações do presente estudo.

Estudos futuros devem utilizar um maior número de amostras para elucidar melhor esta questão. Somado a isso, a microbiota presente na periimplantite tem demonstrado ser mais complexa que a da periodontite crônica. Estudos utilizando métodos de pirosequenciamento tem demonstrado que a periimplantite, apesar de compartilhar alguns dos patógenos da periodontite, apresenta a presença de algumas bactérias não detectadas na doença periodontal (Koyanagi et al., 2013). Ainda, publicações recentes têm demonstrado que, apesar de possuir patógenos comuns, a análise do microbioma da periimplantite aparenta possuir relações sinérgicas diferentes da periodontite (Maruyama et al., 2014).

A performance antimicrobiana da TFA foi numericamente melhor que o uso da tetraciclina tópica, sem alcançar diferenças estatísticas, muito provavelmente pelo reduzido número de amostras. A descontaminação é um dos fatores para a ocorrência da re-osseointegração e regeneração dos tecidos periimplantares (Persson et al., 2001a), e a TFA pode ter um valioso papel neste ponto. Somado a isso há, hoje em dia, uma crescente preocupação em se substituir ao máximo o uso de antibióticos como uma forma de se combater seleção de espécies bacteriana multi-resistentes (Levy and Marshall, 2004, Needleman and Wisson, 2006). Assim, estratégias com a TFA tem ganhado espaço dentre as terapias antimicrobianas e tem um importante papel na substituição de antibióticos comumente utilizados. Por se tratar de uma terapia dose-dependente, um aumento do tempo de exposição luminosa deve também ser considerado em estudos futuros (Bhatti et al., 1997, Luan et al., 2009).

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, pode-se concluir que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana apresenta potencial como agente descontaminante da superfície de implantes, com vantagens numéricas porém, sem diferenças estatísticas frente ao uso tópico da tetraciclina. Porém, estudos com um maior número de amostras e com técnicas mais específicas para análise do microbioma devem ser conduzidos para melhor elucidar esta questão.

A exposição precoce após o tratamento é um fator limitante para o ganho ósseo e re-osseointegração em implantes acometidos pela periimplantite, independentemente do método de descontaminação empregado. O uso de regeneração óssea guiada não otimizou os parâmetros relacionados a formação de novo osso/re-osseointegração. Este resultado, porém, deve ser interpretado com cautela devido à falta de padronização dos defeitos, decorrente da progressão natural das lesões neste modelo experimental. A criação de um modelo onde os defeitos sejam estandardizados pode ser valiosa para a elucidação da necessidade e indicação de procedimentos regenerativos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agerbaek, M. R., Lang, N. P. & Persson, G. R. (2006) Comparisons of bacterial patterns present at implant and tooth sites in subjects on supportive periodontal therapy. I. Impact of clinical variables, gender and smoking. *Clin Oral Implants Res* **17**, 18-24. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01190.x.
- Aghaloo, T. L., Misch, C., Lin, G. H., Iacono, V. J. & Wang, H. L. (2016) Bone Augmentation of the Edentulous Maxilla for Implant Placement: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants* **31 Suppl**, s19-30. doi:10.11607/jomi.16suppl.g1.
- Aguirre-Zorzano, L. A., Estefania-Fresco, R., Telletxea, O. & Bravo, M. (2014) Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12462.
- Albouy, J.-P., Abrahamsson, I., Persson, L. G. & Berglundh, T. (2009) Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs II: histological observations. *Clin Oral Implants Res* **20**, 366-371. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01645.x.
- Albouy, J. P., Abrahamsson, I., Persson, L. G. & Berglundh, T. (2011) Implant surface characteristics influence the outcome of treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **38**, 58-64. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01631.x.
- Albrektsson, T., Dahlin, C., Jemt, T., Sennerby, L., Turri, A. & Wennerberg, A. (2014) Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res* **16**, 155-165. doi:10.1111/cid.12142.
- Albrektsson, T. & Isidor, F. (1994) Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T (eds). *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. Quintessence*, 365-369.
- Antunes, A. A., Grossi-Oliveira, G. A., Martins-Neto, E. C., Almeida, A. L. & Salata, L. A. (2015) Treatment of circumferential defects with osseointegrative xenografts of different porosities: a histological, histometric, resonance frequency analysis, and micro-CT study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* **17 Suppl 1**, e202-220. doi:10.1111/cid.12181.
- Aoki, M., Takanashi, K., Matsukubo, T., Yajima, Y., Okuda, K., Sato, T. & Ishihara, K. (2012) Transmission of periodontopathic bacteria from natural teeth to implants. *Clin Implant Dent Relat Res* **14**, 406-411. doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00260.x.

- Bassetti, M., Schar, D., Wicki, B., Eick, S., Ramseier, C. A., Arweiler, N. B., Sculean, A. & Salvi, G. E. (2014) Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **25**, 279-287. doi:10.1111/clr.12155.
- Becker, W., Becker, B. E., Newman, M. G. & Nyman, S. (1990) Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* **5**, 31-38.
- Berglundh, T., Gotfredsen, K., Zitzmann, N. U., Lang, N. P. & Lindhe, J. (2007) Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **18**, 655-661. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01397.x.
- Berglundh, T., Zitzmann, N. U. & Donati, M. (2011) Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 188-202. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01672.x.
- Bhatti, M., MacRobert, A., Meghji, S., Henderson, B. & Wilson, M. (1997) Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol* **65**, 1026-1031.
- Bosch, C., Melsen, B. & Vargervik, K. (1998) Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* **9**, 310-316.
- Branemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindstrom, J. & Ohlsson, A. (1969) Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* **3**, 81-100.
- Braun, A., Dehn, C., Krause, F. & Jepsen, S. (2008) Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **35**. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01303.x.
- Canullo, L., Penarrocha-Oltra, D., Covani, U., Botticelli, D., Serino, G. & Penarrocha, M. (2015) Clinical and microbiological findings in patients with peri-implantitis: a cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12557.
- Carcuac, O., Abrahamsson, I., Albouy, J. P., Linder, E., Larsson, L. & Berglundh, T. (2013) Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **24**, 363-371. doi:10.1111/clr.12067.

- Chan, H. L., Oh, W. S., Ong, H. S., Fu, J. H., Steigmann, M., Sierraalta, M. & Wang, H. L. (2013) Impact of implantoplasty on strength of the implant-abutment complex. *Int J Oral Maxillofac Implants* **28**, 1530-1535. doi:10.11607/jomi.3227.
- Cho-Yan Lee, J., Mattheos, N., Nixon, K. C. & Ivanovski, S. (2012) Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clin Oral Implants Res* **23**, 325-333. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02264.x.
- Cosyn, J., Van Aelst, L., Collaert, B., Persson, G. R. & De Bruyn, H. (2011) The peri-implant sulcus compared with internal implant and suprastructure components: a microbiological analysis. *Clin Implant Dent Relat Res* **13**, 286-295. doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00220.x.
- Dahlen, G., Charalampakis, G., Abrahamsson, I., Bengtsson, L. & Falsen, E. (2012) Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *J Periodontol Res* **47**, 354-364. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01440.x.
- Dahlin, C., Alberius, P. & Linde, A. (1991a) Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg* **74**, 487-491. doi:10.3171/jns.1991.74.3.0487.
- Dahlin, C., Andersson, L. & Linde, A. (1991b) Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res* **2**, 159-165.
- Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. & Nyman, S. (1989) Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* **4**, 19-25.
- de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., Jr. & Taba, M., Jr. (2007) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* **78**, 965-973. doi:10.1902/jop.2007.060494.
- de Waal, Y. C., Raghoobar, G. M., Huddleston Slater, J. J., Meijer, H. J., Winkel, E. G. & van Winkelhoff, A. J. (2013) Implant decontamination during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Periodontol* **40**, 186-195. doi:10.1111/jcpe.12034.
- de Waal, Y. C., Raghoobar, G. M., Meijer, H. J., Winkel, E. G. & van Winkelhoff, A. J. (2014) Implant decontamination with 2% chlorhexidine during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, controlled trial. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12419.

- Deppe, H., Mucke, T., Wagenpfeil, S., Kesting, M. & Sculean, A. (2013) Nonsurgical antimicrobial photodynamic therapy in moderate vs severe peri-implant defects: a clinical pilot study. *Quintessence Int* **44**, 609-618. doi:10.3290/j.qi.a29505.
- Derks, J. & Tomasi, C. (2015) Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol* **42 Suppl 16**, S158-171. doi:10.1111/jcpe.12334.
- DiVito, E. E., Benjamin, S. D. & LeBeau, J. (2014) Advances in laser dentistry: expanding beyond periodontal care. *Compend Contin Educ Dent* **35**, 734-735.
- Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* **11**, 318-326.
- Dortbudak, O., Haas, R., Bernhart, T. & Mailath-Pokorny, G. (2001) Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **12**. doi:10.1034/j.1600-0501.2001.012002104.x.
- Elter, C., Heuer, W., Demling, A., Hannig, M., Heidenblut, T., Bach, F. W. & Stiesch-Scholz, M. (2008) Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants* **23**, 327-334.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. & Muller, G. A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**, 235-244.
- Ericsson, I., Persson, L. G., Berglundh, T., Edlund, T. & Lindhe, J. (1996) The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **7**, 320-328.
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Felice, P., Karatzopoulos, G., Worthington, H. V. & Coulthard, P. (2009) The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* **2**, 167-184.
- Faggion, C. M., Jr., Listl, S., Fruhauf, N., Chang, H. J. & Tu, Y. K. (2014) A systematic review and Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials on non-surgical treatments for peri-implantitis. *J Clin Periodontol* **41**, 1015-1025. doi:10.1111/jcpe.12292.

- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Ferreira, S. D., Silva, G. L. M., Cortelli, J. R., Costa, J. E. & Costa, F. O. (2006) Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol* **33**. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01001.x.
- Fickl, S., Kebschull, M., Calvo-Guirado, J. L., Hurzeler, M. & Zuh, O. (2015) Experimental Peri-Implantitis around Different Types of Implants - A Clinical and Radiographic Study in Dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* **17 Suppl 2**, e661-669. doi:10.1111/cid.12303.
- Fox, S. C., Moriarty, J. D. & Kusy, R. P. (1990) The effects of scaling a titanium implant surface with metal and plastic instruments: an in vitro study. *J Periodontol* **61**, 485-490. doi:10.1902/jop.1990.61.8.485.
- Froum, S. J. & Rosen, P. S. (2012) A proposed classification for peri-implantitis. *Int J Periodontics Restorative Dent* **32**, 533-540.
- Furst, M. M., Salvi, G. E., Lang, N. P. & Persson, G. R. (2007) Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res* **18**, 501-508. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01381.x.
- Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. & Wennstrom, J. (1986) New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* **13**, 604-616.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1997) Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol* **24**, 767-776.
- Hanisch, O., Cortella, C. A., Boskovic, M. M., James, R. A., Slots, J. & Wikesjo, U. M. (1997a) Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. *J Periodontol* **68**, 59-66. doi:10.1902/jop.1997.68.1.59.
- Hanisch, O., Tatakis, D. N., Boskovic, M. M., Rohrer, M. D. & Wikesjo, U. M. (1997b) Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2. *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**, 604-610.
- Hanisch, O., Tatakis, D. N., Rohrer, M. D., Wohrle, P. S., Wozney, J. M. & Wikesjo, U. M. (1997c) Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**, 785-792.

- Hayek, R. R., Araujo, N. S., Gioso, M. A., Ferreira, J., Baptista-Sobrinho, C. A., Yamada, A. M. & Ribeiro, M. S. (2005) Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* **76**, 1275-1281. doi:10.1902/jop.2005.76.8.1275.
- Heitz-Mayfield, L. J., Salvi, G. E., Mombelli, A., Faddy, M., Lang, N. P. & Implant Complication Research, G. (2012) Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* **23**, 205-210. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02276.x.
- John, G., Sahm, N., Becker, J. & Schwarz, F. (2015) Nonsurgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine. Twelve-month follow-up of a prospective, randomized, controlled clinical study. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-015-1406-7.
- Koyanagi, T., Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Maruyama, N., Ohkuma, M. & Izumi, Y. (2013) Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* **40**, 218-226. doi:10.1111/jcpe.12047.
- Koyanagi, T., Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Ohkuma, M. & Izumi, Y. (2010) Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol* **2**. doi:10.3402/jom.v2i0.5104.
- Kreisler, M., Kohnen, W., Christoffers, A. B., Gotz, H., Jansen, B., Duschner, H. & d'Hoedt, B. (2005) In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er : YAG laser and an air powder system. *Clin Oral Implants Res* **16**. doi:10.1111/j.1600-0501.2004.01056.x.
- Kreisler, M., Kohnen, W., Marinello, C., Gotz, H., Duschner, H., Jansen, B. & d'Hoedt, B. (2002) Bactericidal effect of the Er : YAG laser on dental implant surfaces: An in vitro study. *J Periodontol* **73**. doi:10.1902/jop.2002.73.11.1292.
- Lang, N. P., Berglundh, T. & Working Group 4 of Seventh European Workshop on, P. (2011) Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 178-181. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x.
- Lasho, D. J., O'Leary, T. J. & Kafrawy, A. H. (1983) A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. *J Periodontol* **54**, 210-220. doi:10.1902/jop.1983.54.4.210.

- Levy, S. B. & Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* **10**, S122-129. doi:10.1038/nm1145.
- Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B. & Marinello, C. (1992) Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* **3**, 9-16.
- Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965) Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* **36**, 177-187. doi:10.1902/jop.1965.36.3.177.
- Luan, X. L., Qin, Y. L., Bi, L. J., Hu, C. Y., Zhang, Z. G., Lin, J. & Zhou, C. N. (2009) Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci* **24**. doi:10.1007/s10103-007-0513-3.
- Lulic, M., Leiggener Gorog, I., Salvi, G. E., Ramseier, C. A., Mattheos, N. & Lang, N. P. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x.
- Martins, M. C., Shibli, J. A., Abi-Rached, R. S. & Marcantonio, E., Jr. (2005) Progression of experimental chronic peri-implantitis in dogs: clinical and radiographic evaluation. *J Periodontol* **76**, 1367-1373. doi:10.1902/jop.2005.76.8.1367.
- Maruyama, N., Maruyama, F., Takeuchi, Y., Aikawa, C., Izumi, Y. & Nakagawa, I. (2014) Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci Rep* **4**, 6602. doi:10.1038/srep06602.
- Meisel, P. & Kocher, T. (2005) Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **79**. doi:10.1016/j.jphotobiol.2004.11.023.
- Mellonig, J. T. & Nevins, M. (1995) Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. *Int J Periodontics Restorative Dent* **15**, 168-185.
- Mitton, D. & Ackroyd, R. (2005) History of photodynamic therapy in Great Britain. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2**, 239-246. doi:10.1016/S1572-1000(05)00111-0.
- Moreira, A. L., Novaes, A. B., Jr., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B., de Oliveira, P. G., Casati, M. Z., Casarin, R. C. & Messoria, M. R. (2015) Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* **86**, 376-386. doi:10.1902/jop.2014.140392.

- Murray, G., Holden, R. & Roschlau, W. (1957) Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg* **93**, 385-387.
- Namgoong, H., Kim, M. D., Ku, Y., Rhyu, I. C., Lee, Y. M., Seol, Y. J., Gu, H. J., Susin, C., Wikesjo, U. M. & Koo, K. T. (2015) Bone reconstruction after surgical treatment of experimental peri-implantitis defects at a sandblasted/acid-etchedhydroxyapatite-coated implant: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12457.
- Needleman, I. & Wisson, M. (2006) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* **33**, 157; author reply 157-158. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00894_1.x.
- Nociti, F. H., de Toledo, R. C., Machado, M. A. N., Stefani, C. M., Line, S. R. P. & Goncalves, R. B. (2001a) Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **12**. doi:10.1034/j.1600-0501.2001.012004295.x.
- Nociti, F. H., Jr., Caffesse, R. G., Sallum, E. A., Machado, M. A., Stefani, C. M. & Sallum, A. W. (2000) Evaluation of guided bone regeneration and/or bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects: a morphometric study in dogs. *J Oral Implantol* **26**, 244-249. doi:10.1563/1548-1336(2000)026<0244:EOGBRA>2.3.CO;2.
- Nociti, F. H., Jr., Machado, M. A., Stefani, C. M. & Sallum, E. A. (2001b) Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs: a histometric investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**, 646-652.
- Nyman, S., Gottlow, J., Lindhe, J., Karring, T. & Wennstrom, J. (1987) New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodontal Res* **22**, 252-254.
- Papadopoulos, C. A., Vouros, I., Menexes, G. & Konstantinidis, A. (2015) The utilization of a diode laser in the surgical treatment of peri-implantitis. A randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-014-1397-9.
- Park, J. B. (2012) Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone and tetracycline: a case report. *Gerodontology* **29**, 145-149. doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00470.x.
- Park, S. Y., Kim, K. H., Rhee, S. H., Lee, J. C., Shin, S. Y., Lee, Y. M. & Seol, Y. J. (2015) An immediate peri-implantitis induction model to study regenerative peri-implantitis treatments. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12611.

- Parlar, A., Bosshardt, D. D., Cetiner, D., Schafroth, D., Unsal, B., Haytac, C. & Lang, N. P. (2009) Effects of decontamination and implant surface characteristics on re-osseointegration following treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **20**, 391-399. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01655.x.
- Persson, G. R., Salvi, G. E., Heitz-Mayfield, L. J. & Lang, N. P. (2006) Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (Arestin) in the treatment of peri-implantitis. I: Microbiological outcomes. *Clin Oral Implants Res* **17**, 386-393. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01269.x.
- Persson, G. R., Samuelsson, E., Lindahl, C. & Renvert, S. (2010) Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. *J Clin Periodontol* **37**, 563-573. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01561.x.
- Persson, L. G., Araujo, M. G., Berglundh, T., Grondahl, K. & Lindhe, J. (1999) Resolution of peri-implantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **10**, 195-203.
- Persson, L. G., Berglundh, T., Sennerby, L. & Lindhe, A. (2001a) Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces - An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **12**. doi:10.1034/j.1600-0501.2001.120607.x.
- Persson, L. G., Ericsson, I., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2001b) Osseointegration following treatment of peri-implantitis and replacement of implant components. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* **28**, 258-263.
- Petersilka, G., Faggion, C. M., Jr., Stratmann, U., Gerss, J., Ehmke, B., Haeberlein, I. & Flemmig, T. F. (2008) Effect of glycine powder air-polishing on the gingiva. *J Clin Periodontol* **35**, 324-332. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01195.x.
- Polansky, R., Haas, M., Heschl, A. & Wimmer, G. (2009) Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**, 575-580.
- Pontoriero, R., Tonelli, M. P., Carnevale, G., Mombelli, A., Nyman, S. R. & Lang, N. P. (1994) Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* **5**, 254-259.
- Qin, Y., Luan, X., Bi, L., He, G., Bai, X., Zhou, C. & Zhang, Z. (2008a) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* **23**, 49-54. doi:10.1007/s10103-007-0454-x.

- Qin, Y. L., Luan, X. L., Bi, L. J., Sheng, Y. Q., Zhou, C. N. & Zhang, Z. G. (2008b) Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res* **43**, 162-167. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01007.x.
- Quirynen, M., Vogels, R., Peeters, W., van Steenberghe, D., Naert, I. & Haffajee, A. (2006) Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* **17**, 25-37. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01194.x.
- Raab, O. (1900) Über die Wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Z Biol* **39**, 524-546.
- Ramos, U. D., Ayub, L. G., Reino, D. M., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B. & Novaes, A. B., Jr. (2015) Antimicrobial Photodynamic Therapy as an alternative to Systemic Antibiotics: Results from a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Study on type 2 Diabetics. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12498.
- Renvert, S., Lessem, J., Dahlen, G., Lindahl, C. & Svensson, M. (2006) Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **33**, 362-369. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.00919.x.
- Renvert, S., Lessem, J., Dahlen, G., Renvert, H. & Lindahl, C. (2008) Mechanical and repeated antimicrobial therapy using a local drug delivery system in the treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol* **79**, 836-844. doi:10.1902/jop.2008.070347.
- Renvert, S., Lindahl, C., Roos Jansaker, A. M. & Persson, G. R. (2011) Treatment of peri-implantitis using an Er:YAG laser or an air-abrasive device: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **38**, 65-73. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01646.x.
- Renvert, S., Samuelsson, E., Lindahl, C. & Persson, G. R. (2009) Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. *J Clin Periodontol* **36**, 604-609. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01421.x.
- Rober, M., Quirynen, M., Haffajee, A. D., Schepers, E. & Teughels, W. (2008) Intra-oral microbial profiles of beagle dogs assessed by checkerboard DNA-DNA hybridization using human probes. *Vet Microbiol* **127**, 79-88. doi:10.1016/j.vetmic.2007.08.007.

- Romeo, E., Lops, D., Chiapasco, M., Ghisolfi, M. & Vogel, G. (2007) Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome. *Clin Oral Implants Res* **18**, 179-187. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01318.x.
- Roos-Jansaker, A. M., Renvert, H., Lindahl, C. & Renvert, S. (2007) Surgical treatment of peri-implantitis using a bone substitute with or without a resorbable membrane: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol* **34**, 625-632. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01102.x.
- Sachdeva, S. & Agarwal, V. (2011) Evaluation of commercially available biodegradable tetracycline fiber therapy in chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* **15**, 130-134. doi:10.4103/0972-124X.84381.
- Salvi, G. E., Aglietta, M., Eick, S., Sculean, A., Lang, N. P. & Ramseier, C. A. (2012) Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Implants Res* **23**, 182-190. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02220.x.
- Salvi, G. E. & Ramseier, C. A. (2015) Efficacy of patient-administered mechanical and/or chemical plaque control protocols in the management of peri-implant mucositis. A systematic review. *J Clin Periodontol* **42 Suppl 16**, S187-201. doi:10.1111/jcpe.12321.
- Schou, S., Holmstrup, P., Jorgensen, T., Skovgaard, L. T., Stoltze, K., Hjorting-Hansen, E. & Wenzel, A. (2003) Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res* **14**, 412-422.
- Schou, S., Holmstrup, P., Stoltze, K., Hjorting-Hansen, E., Fiehn, N. E. & Skovgaard, L. T. (2002) Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva - A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res* **13**. doi:10.1034/j.1600-0501.2002.130201.x.
- Schwarz, F., Bieling, K., Bonsmann, M., Latz, T. & Becker, J. (2006a) Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study. *Clin Oral Investig* **10**, 279-288. doi:10.1007/s00784-006-0070-3.
- Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Bieling, K., Sculean, A. & Becker, J. (2007) Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res* **18**, 161-170. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01320.x.

- Schwarz, F., Iglhaut, G. & Becker, J. (2012a) Quality assessment of reporting of animal studies on pathogenesis and treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis. A systematic review using the ARRIVE guidelines. *J Clin Periodontol* **39**. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01838.x.
- Schwarz, F., Jepsen, S., Hertten, M., Sager, M., Rothamel, D. & Becker, J. (2006b) Influence of different treatment approaches on non-submerged and submerged healing of ligature induced peri-implantitis lesions: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* **33**, 584-595. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.00956.x.
- Schwarz, F., John, G. & Becker, J. (2015) Reentry After Combined Surgical Resective and Regenerative Therapy of Advanced Peri-implantitis: A Retrospective Analysis of Five Cases. *Int J Periodontics Restorative Dent* **35**, 647-653. doi:10.11607/prd.2320.
- Schwarz, F., John, G., Mainusch, S., Sahm, N. & Becker, J. (2012b) Combined surgical therapy of peri-implantitis evaluating two methods of surface debridement and decontamination. A two-year clinical follow up report. *J Clin Periodontol* **39**, 789-797. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01867.x.
- Schwarz, F., Sahm, N. & Becker, J. (2014) Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis lesions with concomitant soft tissue volume augmentation. A case series. *Clin Oral Implants Res* **25**, 132-136. doi:10.1111/clr.12103.
- Schwarz, F., Sahm, N., Iglhaut, G. & Becker, J. (2011a) Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol* **38**, 276-284. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01690.x.
- Schwarz, F., Sahm, N., Mihatovic, I., Golubovic, V. & Becker, J. (2011b) Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. *J Clin Periodontol* **38**, 939-949. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01739.x.
- Schwarz, F., Sahm, N., Schwarz, K. & Becker, J. (2010) Impact of defect configuration on the clinical outcome following surgical regenerative therapy of peri-implantitis. *J Clin Periodontol* **37**, 449-455. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01540.x.
- Sharon, E., Shapira, L., Wilensky, A., Abu-Hatoum, R. & Smidt, A. (2013) Efficiency and thermal changes during implantoplasty in relation to bur type. *Clin Implant Dent Relat Res* **15**, 292-296. doi:10.1111/j.1708-8208.2011.00366.x.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Garcia, V. G. & Marcantonio, E. (2002) Treatment of peri-implantitis by lethal photosensitization: a microbiological. *Journal of Dental Research* **81**.

- Shibli, J. A., Martins, M. C., Lotufo, R. F. M. & Marcantonio, E. (2003a) Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **18**.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Nociti, F. H., Jr., Garcia, V. G. & Marcantonio, E., Jr. (2003b) Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* **74**, 338-345. doi:10.1902/jop.2003.74.3.338.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Ribeiro, F. S., Garcia, V. G. & Nociti, F. H. (2006) Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **17**. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01167.x.
- Shibli, J. A., Melo, L., Ferrari, D. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M. & Feres, M. (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* **19**, 975-982. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x.
- Stabholz, A., Kettering, J., Aprecio, R., Zimmerman, G., Baker, P. J. & Wikesjo, U. M. (1993a) Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. *J Clin Periodontol* **20**, 557-562.
- Stabholz, A., Kettering, J., Aprecio, R., Zimmerman, G., Baker, P. J. & Wikesjo, U. M. (1993b) Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. *J Periodontol* **64**, 137-141. doi:10.1902/jop.1993.64.2.137.
- Sul, Y. T., Johansson, C., Wennerberg, A., Cho, L. R., Chang, B. S. & Albrektsson, T. (2005) Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* **20**, 349-359.
- Sumida, S., Ishihara, K., Kishi, M. & Okuda, K. (2002) Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**, 696-702.
- Susin, C., Fiorini, T., Lee, J., De Stefano, J. A., Dickinson, D. P. & Wikesjo, U. M. (2015) Wound healing following surgical and regenerative periodontal therapy. *Periodontol 2000* **68**, 83-98. doi:10.1111/prd.12057.
- Takasaki, A. A., Aoki, A., Mizutani, K., Kikuchi, S., Oda, S. & Ishikawa, I. (2007) Er:YAG laser therapy for peri-implant infection: a histological study. *Lasers Med Sci* **22**, 143-157. doi:10.1007/s10103-006-0430-x.

- Terranova, V. P., Franzetti, L. C., Hic, S., DiFlorio, R. M., Lyall, R. M., Wikesjo, U. M., Baker, P. J., Christersson, L. A. & Genco, R. J. (1986) A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontal Res* **21**, 330-337.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I. & Quirynen, M. (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* **17 Suppl 2**, 68-81. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x.
- Tonetti, M. S., Chapple, I. L., Jepsen, S. & Sanz, M. (2015) Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol* **42 Suppl 16**, S1-4. doi:10.1111/jcpe.12382.
- Usacheva, M. N., Teichert, M. C. & Biel, M. A. (2001) Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* **29**, 165-173.
- Usacheva, M. N., Teichert, M. C. & Biel, M. A. (2003) The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B* **71**, 87-98.
- Uzel, N. G., Teles, F. R., Teles, R. P., Song, X. Q., Torresyap, G., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2011) Microbial shifts during dental biofilm re-development in the absence of oral hygiene in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* **38**, 612-620. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01730.x.
- van Winkelhoff, A. J., Goene, R. J., Benschop, C. & Folmer, T. (2000) Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* **11**, 511-520.
- von Tappeiner, H. & Jesionek, A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Med Wochenschr* **47**, 2042-2044.
- von Trappeiner, H. & Jodlabauer, A. (1904) Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozan und Enzyme. *Dtsche Arch Klin Med* **80**, 427-487.
- Waerhaug, J. (1978) Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. II: As observed on extracted teeth. *J Periodontol* **49**, 119-134. doi:10.1902/jop.1978.49.3.119.

- Wainwright, M. (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**. doi:10.1093/jac/42.1.13.
- Warrer, K., Buser, D., Lang, N. P. & Karring, T. (1995) Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* **6**, 131-138.
- Wennerberg, A. & Albrektsson, T. (2009) Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* **20 Suppl 4**, 172-184. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
- Wetzel, A. C., Vlassis, J., Caffesse, R. G., Hammerle, C. H. & Lang, N. P. (1999) Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **10**, 111-119.
- Wikesjö, U. M., Baker, P. J., Christersson, L. A., Genco, R. J., Lyall, R. M., Hic, S., DiFlorio, R. M. & Terranova, V. P. (1986) A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res* **21**, 322-329.
- Wikesjö, U. M., Claffey, N., Nilveus, R. & Egelberg, J. (1991) Periodontal repair in dogs: effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. *J Periodontol* **62**, 180-184. doi:10.1902/jop.1991.62.3.180.
- Yamamoto, A. & Tanabe, T. (2013) Treatment of Peri-implantitis Around TiUnite-Surface Implants Using Er:YAG Laser Microexplosions. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **33**, 21-29. doi:10.11607/prd.1593.
- Yoshikawa, K., Kurata, H., Iwahara, S. & Kada, T. (1978) Photodynamic action of fluorescein dyes in DNA-damage and in vitro inactivation of transforming DNA in bacteria. *Mutat Res* **56**, 359-362.
- You, T. M., Choi, B. H., Zhu, S. J., Jung, J. H., Lee, S. H., Huh, J. Y., Lee, H. J. & Li, J. (2007) Treatment of experimental peri-implantitis using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **103**, 34-37. doi:10.1016/j.tripleo.2006.01.005.
- Zechner, W., Kneissel, M., Kim, S., Ulm, C., Watzek, G. & Plenk, H., Jr. (2004) Histomorphometrical and clinical comparison of submerged and nonsubmerged implants subjected to experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **15**, 23-33.

- Zeina, B., Greenman, J., Corry, D. & Purcell, W. M. (2002) Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol* **146**, 568-573.
- Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Ericsson, I. & Lindhe, J. (2004) Spontaneous progression of experimentally induced periimplantitis. *J Clin Periodontol* **31**, 845-849. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00567.x.
- Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Marinello, C. P. & Lindhe, J. (2001) Experimental peri-implant mucositis in man. *J Clin Periodontol* **28**, 517-523.

ANEXOS

Anexo 1 - Artigo em ingles Histomorfometria

Clinical Oral Implants Research - Manuscript Copy

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH WILEY

Comparison between two treatment protocols with or without Guided Bone Regeneration on the treatment of Periimplantitis in a dog model: a histometric and histomorphometric study.

Journal:	<i>Clinical Oral Implants Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ramos, Umberto; University of sao paulo , Traumatology, Buccomaxillofacial Surgery and Periodontics; Dental Office, Private Suaid, Flávia; University of São Paulo, Department of Bucco-Maxilo-Facial Surgery and Traumatology and Periodontology Wikesjö, Ulf; Medical College of Georgia School of Dentistry, Oral Biology & Periodontics Susin, Cristiano; Dental College of Georgia, Periodontics; Taba Jr, Mario; Univeristy of Sao Paulo, Novaes Jr, Arthur B; Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, USP, Oral Surgery and Periodontology
Keywords:	Animal Experiments, Bone substitutes, Wound healing, Biomaterials, Guided tissue regeneration, Bone regeneration

SCHOLARONE™
Manuscripts

Clinical Oral Implants Research - Manuscript Copy

Title: Comparison between two treatment protocols with or without Guided Bone Regeneration on the treatment of Periimplantitis in a dog model: a histometric and histomorphometric study.

Umberto Demoner Ramos*, Flavia Suaid**, Ulf ME Wiksejo***, Cristiano Susin***, Arthur Belém Novaes Jr.***

*PhD Student at University of São Paulo (FORP-USP)

**PhD, University of São Paulo

***Laboratory for Applied Periodontal & Craniofacial Regeneration (LAPCR), Augusta University, Dental College of Georgia, Augusta, GA, USA

****Titular Professor at University of São Paulo (FORP-USP)

Running title: Re-osseointegration on induced periimplantitis

Corresponding author:

Umberto Demoner Ramos

Rua misael pedreira da silva, 98 sala 102 Santa lúcia.

Vitoria-ES, Brazil ZIP CODE 23056-230

Abstract:

Objectives: This study used a dog model to evaluate two anti-infective treatment protocols for the treatment of periimplantitis with or without the use of guided bone regeneration (GBR).

Material and Methods: Eight beagle dogs received eight implants each. After 8 weeks, silk ligatures were installed and then removed after 8 weeks, and after the end of 10 weeks the lesions were treated either with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) or topical tetracycline hydrochloride 50mg/ml with and without guided bone regeneration. The animals were euthanized 12 weeks after treatment and submitted to histological processing. The outcomes evaluated included: linear bone gain (mm), bone gain (%), and re-osseointegration (%). The effects of the implant site, early exposure and type of anti-infective treatment on bone regeneration were evaluated.

Results: The overall results failed to detect significant differences between the anti-infective treatments and the adjunctive use of guided bone regeneration failed provide better re-osseointegration or bone gain in either of the anti-infective treatments. Buccal sites and implant early exposure negatively affect bone regeneration.

Conclusion: Both anti-infective therapies stand-alone or combined with guided bone regeneration allowed similar and partial bone gain, without the use of systemic antibiotics.

INTRODUCTION

The dental implant-anchored prosthesis has become a *de facto* alternative for the replacement of missing or terminally failing teeth. Whereas dental implant long-term survival rates approach 95% (Moraschini et al., 2015), biological and mechanical complications account for a significant decrease for failing implants. Peri-implantitis, a biological complication, is an inflammatory lesion caused by oral bacteria leading to loss of bone at osseointegrated dental implants (Lang et al., 2011). According to a recent meta-analysis, the overall prevalence of peri-implantitis approximates 22% (Derks and Tomasi, 2015), confirmed by the first population-based epidemiologic study on peri-implantitis (Derks et al., 2016, Tenenbaum et al., 2016). Peri-implantitis and chronic periodontitis share several biological and clinical characteristics (Berghundh et al., 2011). However, human peri-implantitis lesions appear larger, deeper, and present with higher counts of neutrophilic granulocytes and osteoclasts than human periodontitis lesions (Carcuac and Berghundh, 2014) also verified in animal models (Carcuac et al., 2013).

Thorough cleansing of the exposed implant appears a prerequisite for resolution of the peri-implant inflammatory lesion, however insufficient to promote bone regeneration and re-osseointegration (Persson et al., 2001). Several methods including antimicrobials, disinfectants, abrasive technologies and lasers have been proposed to cleanse the exposed implant (Salvi et al., 2007, Romanos et al., 2009, Park, 2012, de Waal et al., 2014, Hanisch et al., 1997). In clinical settings, however, access to effectively decontaminate the implant appears seriously limited by the implant macro- and microstructure and the peri-implant bone configuration. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been introduced to potentially address some of these limitations. aPDT represents a technology in which the bacterial intra- and extracellular structures are targeted by a photosensitizer that absorbs light energy, usually from a red laser source, and produces singlete oxygen and protein denaturation inside the bacteria leading to bacterial cell death. Others suggest

that aPDT inactivates TNF- α (Braham et al., 2009), an important cytokine present in advanced peri-implantitis (Duarte et al., 2009) that increases osteoclast responsiveness (Nakashima et al., 2000). Clinical studies have shown promise following the use of aPDT in periodontal defects (Lulic et al., 2009, Moreira et al., 2015, Ramos et al., 2015). Moreover, red laser has been shown to improve bone healing and osseointegration in animal models (Blay et al., 2015, Mayer et al., 2015).

Guided bone regeneration (GBR) has been used for dental implant site preparation over more than 30 years (Nyman et al., 1990). Recent clinical studies report the use of various bone biomaterials as stand-alone treatments or embedded in a GBR protocol in the management of the peri-implantitis defects (Roos-Jansaker et al., 2007, Schwarz et al., 2009, Roccuzzo et al., 2011). Bone biomaterials of human or animal origin have become preferred options; a bovine bone mineral (BBM) appearing the most widely studied biomaterial for GBR (Esposito et al., 2014). Nevertheless, to date, no predictable regenerative treatment has emerged in the clinical management of peri-implantitis (Esposito et al., 2012, Persson et al., 1999, Renvert et al., 2009). Few studies have evaluated aPDT as an adjunctive anti-infective therapy in the management of peri-implantitis (Dortbudak et al., 2001, Shibli et al., 2003, Shibli et al., 2006). The aim of the present study was to compare two anti-infective therapies stand-alone or combined with GBR in the surgical reconstruction of peri-implantitis defects using a dog model.

MATERIAL AND METHODS

The present study followed a protocol approved by the Animal Experimental Ethics Committee, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil (protocol number 06.1.458.53.5). The study was divided into two phases: 1) induction of ligature induced peri-implantitis; and 2) surgical reconstruction of induced peri-implantitis defects using anti-infective therapy with or without GBR (Figure 1).

Animals

Eight male purpose-bred Beagle dogs, 18-24 months old, approximate weight 15 kg, obtained from a licensed vendor, were used. The animals were individually housed and had *ad libitum* access to water and standard laboratory dog-food-diet throughout the study.

Materials and devices

Titanium dental implants (BoneLevel TML SLA, $\phi 3.3 \times 10$ mm, Straumann, Basel, Switzerland) and healing abutments ($\phi 4.1 \times 3.5$ mm, Straumann, Basel, Switzerland) were used.

A bovine bone biomaterial/BBM (Bio-Oss, Geistlich Pharma, Wollhusen, Switzerland) in combination with a resorbable porcine collagen membrane (Bio-Gide, Geistlich Pharma, Wollhusen, Switzerland) were used for GBR.

For the aPDT, a hand-held, battery-operated, diode laser (HELBO mini-laser 2075 F dent, HELBO Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) was used. The device was set to a wavelength of 660 nm and fluency of 212 mW/cm². The laser was irradiated through an 8.5-cm long flexible fiber optic tip curved at a 60° angle with a $\phi 0.06$ cm spot-size. A 10-mg/mL phenothiazine chloride solution (HELBO Blue Photosensitizer, HELBO Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) was used as photosensitizer.

Surgical procedures

Food was withheld the night preceding surgeries. For all surgical events, the animals were pre-anesthetized using 10% zolazepam (0.10 mL/kg IM) and acepromazine (0.2-0.3 mg/kg IM). The animals were then maintained on gas anesthesia (isoflurane 1-2% to effect). Depth of anesthesia was monitored by lack of response to toe pinch, lack of corneal reflex, and by monitoring depth of respiration, respiratory rate and heart rate; all anesthesia and related procedures performed and

monitored by veterinary staff. Routine dental infiltration anesthesia (mepivacaine 2% norepinephrine 1:100,000) was used at the surgical sites. An opioid (tramadol 3 mg/kg ??? BID) and a non-steroidal anti-inflammatory agent (ketoprofen 1 mg/kg IM SID) were used for postoperative pain control.

Dental implant installation

Flapless bilateral surgical extractions of the mandibular 1st, 2nd, 3rd, and 4th premolar and 1st molar teeth were performed in preparation for dental implant installation. Atraumatic extractions were secured by bi-sectioning the teeth using a high-speed hand-piece and elevators. Interrupted sutures (5.0 Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson, São Jose dos Campos, Brazil) were used for wound closure for primary intention healing. Sutures were removed at 2 wks, the extraction sites allowed to heal for an additional 6 wks.

Mid-crestal incisions were carried out and buccal and lingual mucoperiosteal flap raised to expose the edentulated alveolar ridge for dental implant installation following the manufacturer's protocol. Four dental implants placed in each mandibular jaw quadrant. Flaps were then approximated and sutured using non-resorbable sutures (5-0 Mononylon Ethicon, São Jose dos Campos, Brazil) for transmucosal healing (Figure 2). Sutures were removed at 2 wks, the surgical sites allowed to heal for an additional 6 wks.

Peri-implantitis induction

For peri-implantitis induction, silk ligatures (3-0 Silk Ethicon, Johnson & Johnson, São Jose dos Campos, Brazil) were placed around the healing abutments over 8 wks. Ligatures were checked weekly and missing ligatures immediately replaced. Ligatures were then removed and peri-implant lesions were allowed to progress undisturbed for an additional 6 wks (Figure 2). The standard dog-

food-diet was wetted to a slurry during peri-implantitis induction to support dental plaque accumulation.

Peri-implantitis defect reconstruction

A mucoperiosteal flap was elevated without releasing incisions for the surgical reconstruction of the peri-implantitis defects. The defects were then debrided from granulation tissue and exposed dental implants instrumented using plastic curettes (Implacare-IMPHDL6, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). An experienced masked examiner (UDR) estimated the peri-implantitis defect dimensions using a periodontal probe (PCP15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) as follows (Figure 2):

- Defect depth: Distance from the implant platform to the base of the peri-implantitis defect.
- Crestal bone level: Distance from the implant platform to the level of the alveolar crest.

The dental implants were then allocated to one of the following treatments (Figure 2):

- TTC: Exposed dental implants were conditioned with tetracycline HCL for 3 min using cotton pellets soaked in a 50 mg/mL solution, cotton pellets exchanged every 30 sec. The surgical sites were then thoroughly rinsed with sterile saline.
- TTC/GBR: Exposed dental implant were conditioned with tetracycline HCL as described above. The peri-implant defects were then filled to capacity with the particulate BBM, a collagen membrane adapted over the BBM. Fixation devices were not used.
- aPDT: Peri-implant defects were filled to capacity with the photosensitizer, the solution left in place for 5 min. The surgical sites were then thoroughly rinsed with sterile saline to remove the photosensitizer solution to minimize optical shielding. The exposed dental implants were divided into six areas and the laser was applied for 30 sec. over each area for a total dose of 44 J/cm².
- aPDT/GBR: aPDT and GBR carried out as described above.

The surgical sites were closed for primary intention healing using interrupted sutures (5-0 Mononylon Ethicon, São Jose dos Campos, Brazil). Sutures were removed at 14 days postsurgery. The animals were maintained on the softened dog-food-diet for 2 wks. Daily topical application of a 0.12% chlorhexidine gluconate solution (Periogard® 0.12%, Colgate Palmolive, São Paulo, Brazil) was used to support plaque control. The animals were euthanized at 12 wks following reconstructive surgery using a sodium thiopental and potassium chloride overdose administered intravenously following induction of deep anesthesia. Block biopsies including dental implants, alveolar bone and mucosa were then collected and immediately transferred into a large volume 4% neutral phosphate-buffered formalin.

Histologic processing

Formalin fixated specimens were dehydrated using a standard ascending alcohol concentrations and then infiltrated with resin (LR White, London Resin Company, Berkshire, UK). Half of the specimens were sectioned in a mesio-distal and the other half in a bucco-lingual vertical plane using established techniques (Donath and Breuner, 1982). The histological sections were prepared to a final thickness of approximately 40 µm and were then stained using toluidine blue and alizarin red.

Histological evaluation

Two experienced masked examiners (UW and UDR) performed the histopathologic evaluation using incandescent and polarized light microscopy (BX 51, Olympus America, Melville, NY, USA). Observations of peri-implant bone formation and remodeling (formation/resorption), woven and lamellar bone, cortex formation, fibrovascular tissue and marrow, inflammatory response, vascularity, and residual biomaterials (BBM and collagen membrane) were performed.

Histometric analysis

A calibrated masked examiner (UDR) performed the histometric analysis using incandescent and polarized light microscopy (BX51, Olympus America, Melville, NY, USA), a microscope digital camera system (DP73, Olympus America, Melville, NY, USA), and a PC-based image analysis system (cellSens[®] Dimension 1.11 Digital Imaging Software, Olympus America, Melville, NY, USA).

Intra-examiner reproducibility was evaluated by comparing histological measurements made 4 weeks apart. The concordance correlation coefficient according to Lin (2000) was calculated. The concordance correlation coefficients for the histometric assessments were >0.95 indicating a high degree of agreement and small measurement error.

The following histological measurements were collected using central sections from each implant:

- Defect depth: Distance from the implant platform to the base of the peri-implantitis defect pretreatment (verified by two independent examiners).
- Residual defect: Distance from the implant platform to the most coronal bone-implant contact along the implant.
- Crestal bone level: Distance from the implant platform to the alveolar crest.
- Total osseointegration: Fraction bone-implant contact (BIC) from base of the defect to the implant shoulder.
- Osseointegration within newly formed bone: Fraction bone-implant contact (BIC) from the base of the defect to the most coronal bone-implant contact.

Statistical Analysis

Repeated-measures ANOVA was used to compare treatment groups with regards to defect characteristics and treatment outcomes. Measurements made at the implant level were aggregated at the animal level so that the animal was used as the unit of analysis. Generalized estimating equations

1
2
3
4 were used to model the relationship between treatment outcomes (residual defect depth, new bone
5 gain, new bone BIC) and explanatory variables (TTC/aPDT, GBR, site, location, implant exposure).
6
7 Measurements at implant level were used and estimates were adjusted for the clustering of
8
9 observations into animals. An exchangeable correlation and robust variance estimator were used.
10
11
12 Wald tests were used for multiple comparisons and the level of significance was set at 5%.
13
14

15 16 RESULTS

17 18 Clinical findings

19
20 All animals completed the study. Three dental implants failed to osseointegrate, 5 implants were lost
21 during peri-implantitis induction and 1 implant was lost in histological processing leaving 55
22 implants for the histological analysis. Healing following defect reconstruction was generally
23
24 uneventful, however sutureline dehiscencies were observed within 1 wk in two animals. These sites
25
26 were wiped clean using sterile gauze and irrigated with a chlorhexidine gluconate solution
27
28 (Periogard® 0.12%, Colgate Palmolive, São Paulo, Brazil).
29
30
31
32
33

34
35 No significant differences were observed among experimental protocols with regards to the
36
37 peri-implant defect characteristics (Table 1). Mean clinical defect depth ranged from 1.8 ± 0.5 to 2.6
38
39 ± 0.9 mm for the various protocols; crestal bone levels ranging from 0.9 ± 0.9 to 1.3 ± 0.9 mm.
40
41
42

43 44 Histological analysis

45
46 Eleven of the 55 dental implants (20%), equally distributed among experimental protocols aPDT (2),
47
48 TTC (3), aPDT/GBR (4) and TTC/GBR (2), were deemed exposed. A localized inflammatory
49
50 reaction was observed at 5 implants (9%), representing 3 implants receiving TTC and 2 implants
51
52 receiving aPDT/GBR. Twenty-one (75%) of 28 implants receiving GBR exhibited residual BBM
53
54 representing 13 implants receiving aPDT/GBR and 8 implants receiving TTC/GBR. All sites
55
56 showed BBM encapsulated in mature dense connective tissue without indications of associated bone
57
58
59
60

formation (Figure 3). None of the sites showed evidence of BBM resorption, i.e. scalloped borders and/or presence of osteoclast-like cells, or BBM erosion. Six sites receiving aPDT/GBR and 6 sites receiving TTC/GBR exhibited unique BBM particles trapped within newly formed bone (Figure 4), again without overt signs of associated bone metabolic activity. No BBM particles were found in direct contact with implant surfaces.

Histometric analysis

Mean pretreatment defect depth ranged from 2.3 ± 0.8 to 3.0 ± 1.2 mm (Table 1). No significant differences were observed following the experimental protocols with regards to new bone formation and BIC. Total bone gain ranged from 1.0 ± 0.5 to 1.2 ± 0.6 mm equating 47% and 53% resolution of the peri-implantitis defect, in turn demonstrating limited effects of the anti-infective protocols on bone formation and no additive effect of the BBM/collagen membrane GBR protocol. BIC within the limited newly formed bone ranged from $59.2 \pm 11.8\%$ to $68.5 \pm 22.2\%$.

Predictors for residual defect depth, peri-implant bone gain and BIC within newly formed bone are presented in Table 2. No significant effects on treatment outcomes could be observed for TTC or aPDT with or without GBR after adjusting for the other co-factors in the model. Proximal and lingual sites yielded significantly smaller residual defect depth and greater bone gain than buccal sites. Significantly increased bone gain was also observed at posteriorly over anteriorly located implants. Implant exposure had a significant detrimental effect on all parameters evaluated.

DISCUSSION

The aim of the present study was to compare two anti-infective therapies stand-alone or combined with GBR in the surgical reconstruction of peri-implantitis defects using a dog model. Disinfection of the exposed dental implant surface was achieved using topical application of TTC or aPDT. GBR

comprised application of BBM in combination with a collagen membrane. Resolution of the peri-implantitis induced bone defects was incomplete without significant differences among treatments.

Several protocols have been proposed to disinfect the exposed dental implant surface in the management of peri-implantitis, few studies have assessed the effect of aPDT. Using a peri-implantitis dog model, Shibli et al. (2006) compared surgical debridement with aPDT to resolve peri-implantitis defects at four commercially available implant systems. When combined with an expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) membrane for GBR, implants receiving aPDT yielded enhanced osseointegration compared with those receiving surgical debridement alone. Direct comparisons with the present study should however be made with caution. Whereas both studies used aPDT, they were performed using different pre-irradiation intervals, photosensitizer concentration, and laser parameters preventing meaningful conclusions (Shibli et al., 2003, Shibli et al., 2006). In perspective, increasing sensitizer concentration and total light dose/fluency increases the photodynamic activity (Qin et al., 2008a). The present study used a 5-min pre-irradiation interval, which has been shown to optimally target pathogenic bacteria (Qin et al., 2008a, Qin et al., 2008b). The use of multiple applications of aPDT for periodontal treatment has been shown to yield improved outcomes compared with single applications (Lulic et al., 2009, Moreira et al., 2015, Ramos et al., 2015). However, when combined with surgical therapy as in the present study, an extended irradiation interval was used to compensate for that the surgical protocol precluded repeated applications.

In the present study, no significant differences were observed with the use of TTC or aPDT combined with GBR including BBM and a collagen membrane compared with TTC or aPDT stand-alone, linear bone fill ranging from 1.0 to 1.2 mm yielding approximately 50% defect closure. Schwarz et al. (2011) also using the dog peri-implantitis model evaluated GBR including a collagen membrane, BBM, an equine bone block with or without recombinant human bone morphogenetic

protein-2 (rhBMP-2). They concluded that (i) in all groups the investigations failed to predictably obtain complete defect resolution, (ii) the surgical procedure was associated with high exposure rates, nevertheless, defect closure approximating 26% (rhBMP-2) and 13%, respectively, of the approximately 5-mm peri-implantitis defects. In other studies, Nociti et al. (2000) compared GBR using a collagen membrane with or without BBM to sham-surgery and BBM stand-alone again using a dog peri-implantitis model without observing significant differences between protocols. In separate studies the investigators compared a non-resorbable ePTFE membrane with the collagen membrane in presence or absence of BBM without observing significant effects and differences between protocols (Nociti et al., 2001). Collectively, these studies firmly support the notion that GBR with or without BBM may not provide significant or meaningful outcomes in the reconstruction of peri-implantitis defects as it relates to bone formation. In comparison, surgical application of rhBMP-2 in an absorbable collagen sponge carrier (rhBMP-2/ACS) as a stand-alone protocol has been shown support robust clinically relevant bone formation (2.6 mm; 75% defect closure) in a nonhuman primate chronic peri-implantitis model (Hanisch et al. 1997).

Re-osseointegration represents an essential outcome of peri-implantitis reconstruction and may represent an immediate effect of the implant surface decontamination protocol. In the present study BIC ranged from 28% to 36% of the total defect. Considering regenerated bone only, BIC ranged from 59% to 69% with no significant differences among experimental protocols. Previous studies using aPDT and GBR including an ePTFE membrane produced BIC estimates ranging from 15% to 42% (Shibli et al., 2003, Shibli et al., 2006). Disinfection of the peri-implantitis exposed sand-blasted acid-etched implant surface using chlorhexidine combined with systemic metronidazole and GBR including an ePTFE membrane produced a BIC estimate of 20% (Wetzel et al., 1999). Similar results have been shown following the use of a collagen membrane for GBR and implant disinfection using chlorhexidine (Namgoong et al., 2015). In other studies, GBR including a collagen

1
2
3
4 membrane and BBM produced BIC estimates approximating 25% (Nociti et al., 2000, Nociti et al.,
5
6 2001). In comparison, surgical application of rhBMP-2/ACS stand-alone produced BIC estimates
7
8 averaging 40% within newly formed bone covering 75% of the 3.4-mm defects following implant
9
10 cleansing using a citric acid solution and an air-abrasive in the nonhuman primate peri-implantitis
11
12 model (Hanisch et al. 1997) underscoring the efficacy of this candidate treatment.
13

14
15 Within the limitations of this study, it may be concluded that both anti-infective therapies
16
17 stand-alone or combined with GBR using BBM and a collagen membrane allowed similar and partial
18
19 resolution of the peri-implantitis defects without significant differences between protocols.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- Berglundh, T., Zitzmann, N. U. & Donati, M. (2011) Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 188-202. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01672.x.
- Blay, A., Blay, C. C., Tunchel, S., Gehrke, S. A., Shibli, J. A., Groth, E. B. & Zetzell, D. M. (2015) Photobiomodulation on dental implant osseointegration: Removal torque and resonance frequency analysis in rabbits. *J Oral Implantol*. doi:10.1563/aaid-joi-D-15-00064.
- Braham, P., Herron, C., Street, C. & Darveau, R. (2009) Antimicrobial Photodynamic Therapy May Promote Periodontal Healing Through Multiple Mechanisms. *J Periodontol* **80**. doi:10.1902/jop.2009.090214.
- Carcuac, O., Abrahamsson, I., Albouy, J. P., Linder, E., Larsson, L. & Berglundh, T. (2013) Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **24**, 363-371. doi:10.1111/clr.12067.
- Carcuac, O. & Berglundh, T. (2014) Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. *J Dent Res* **93**, 1083-1088. doi:10.1177/0022034514551754.
- de Waal, Y. C., Raghoobar, G. M., Meijer, H. J., Winkel, E. G. & van Winkelhoff, A. J. (2014) Implant decontamination with 2% chlorhexidine during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, controlled trial. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12419.
- Derks, J., Schaller, D., Hakansson, J., Wennstrom, J. L., Tomasi, C. & Berglundh, T. (2016) Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Prevalence of Peri-implantitis. *J Dent Res* **95**, 43-49. doi:10.1177/0022034515608832.
- Derks, J. & Tomasi, C. (2015) Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol* **42 Suppl 16**, S158-171. doi:10.1111/jcpe.12334.
- Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* **11**, 318-326.

- Dortbudak, O., Haas, R., Bernhart, T. & Mailath-Pokorny, G. (2001) Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* **12**. doi:10.1034/j.1600-0501.2001.012002104.x.
- Duarte, P. M., de Mendonca, A. C., Maximo, M. B., Santos, V. R., Bastos, M. F. & Nociti Junior, F. H. (2009) Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res* **20**, 514-520. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01680.x.
- Esposito, M., Felice, P. & Worthington, H. V. (2014) Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. *Cochrane Database Syst Rev* **5**, CD008397. doi:10.1002/14651858.CD008397.pub2.
- Esposito, M., Grusovin, M. G. & Worthington, H. V. (2012) Interventions for replacing missing teeth: treatment of periimplantitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD004970.pub5.
- Hanisch, O., Tatakis, D. N., Boskovic, M. M., Rohrer, M. D. & Wikesjo, U. M. (1997) Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2. *Int J Oral Maxillofac Implants* **12**, 604-610.
- Lang, N. P., Berglundh, T. & Working Group 4 of Seventh European Workshop on, P. (2011) Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 178-181. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x.
- Lulic, M., Leiggener Gorog, I., Salvi, G. E., Ramseier, C. A., Mattheos, N. & Lang, N. P. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x.
- Mayer, L., Gomes, F. V., Carlsson, L. & Gerhardt-Oliveira, M. (2015) Histologic and Resonance Frequency Analysis of Peri-Implant Bone Healing After Low-Level Laser Therapy: An In Vivo Study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **30**, 1028-1035. doi:10.11607/jomi.3382.

- Moraschini, V., Poubel, L. A., Ferreira, V. F. & Barboza Edos, S. (2015) Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* **44**, 377-388. doi:10.1016/j.ijom.2014.10.023.
- Moreira, A. L., Novaes, A. B., Jr., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B., de Oliveira, P. G., Casati, M. Z., Casarin, R. C. & Messoria, M. R. (2015) Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* **86**, 376-386. doi:10.1902/jop.2014.140392.
- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H. & Sakai, H. (2000) Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 768-775. doi:10.1006/bbrc.2000.3379.
- Namgoong, H., Kim, M. D., Ku, Y., Rhyu, I. C., Lee, Y. M., Seol, Y. J., Gu, H. J., Susin, C., Wikesjo, U. M. & Koo, K. T. (2015) Bone reconstruction after surgical treatment of experimental peri-implantitis defects at a sandblasted/acid-etched hydroxyapatite-coated implant: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12457.
- Nociti, F. H., Jr., Caffesse, R. G., Sallum, E. A., Machado, M. A., Stefani, C. M. & Sallum, A. W. (2000) Evaluation of guided bone regeneration and/or bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects: a morphometric study in dogs. *J Oral Implantol* **26**, 244-249. doi:10.1563/1548-1336(2000)026<0244:EOGBRA>2.3.CO;2.
- Nociti, F. H., Jr., Machado, M. A., Stefani, C. M. & Sallum, E. A. (2001) Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs: a histometric investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**, 646-652.
- Nyman, S., Lang, N. P., Buser, D. & Bragger, U. (1990) Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* **5**, 9-14.

- 1
2
3
4 Park, J. B. (2012) Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone and tetracycline: a
5 case report. *Gerodontology* **29**, 145-149. doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00470.x.
6
7
8 Persson, L. G., Araujo, M. G., Berglundh, T., Grondahl, K. & Lindhe, J. (1999) Resolution of peri-
9 implantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **10**,
10 195-203.
11
12
13 Persson, L. G., Ericsson, I., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2001) Osseointegration following treatment
14 of peri-implantitis and replacement of implant components - An experimental study in the
15 dog. *J Clin Periodontol* **28**. doi:10.1034/j.1600-051x.2001.028003258.x.
16
17
18 Qin, Y., Luan, X., Bi, L., He, G., Bai, X., Zhou, C. & Zhang, Z. (2008a) Toluidine blue-mediated
19 photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* **23**,
20 49-54. doi:10.1007/s10103-007-0454-x.
21
22
23 Qin, Y. L., Luan, X. L., Bi, L. J., Sheng, Y. Q., Zhou, C. N. & Zhang, Z. G. (2008b) Comparison of
24 toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for
25 periodontitis in rats. *J Periodontol Res* **43**, 162-167. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01007.x.
26
27
28 Ramos, U. D., Ayub, L. G., Reino, D. M., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B. &
29 Novaes, A. B., Jr. (2015) Antimicrobial Photodynamic Therapy as an alternative to Systemic
30 Antibiotics: Results from a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Study
31 on type 2 Diabetics. *J Clin Periodontol*. doi:10.1111/jcpe.12498.
32
33
34 Renvert, S., Polyzois, I. & Maguire, R. (2009) Re-osseointegration on previously contaminated
35 surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* **20 Suppl 4**, 216-227. doi:10.1111/j.1600-
36 0501.2009.01786.x.
37
38
39 Roccuzzo, M., Bonino, F., Bonino, L. & Dalmaso, P. (2011) Surgical therapy of peri-implantitis
40 lesions by means of a bovine-derived xenograft: comparative results of a prospective study
41 on two different implant surfaces. *J Clin Periodontol* **38**, 738-745. doi:10.1111/j.1600-
42 051X.2011.01742.x.
43
44
45 Romanos, G., Ko, H. H., Froum, S. & Tarnow, D. (2009) The use of CO(2) laser in the treatment of
46 peri-implantitis. *Photomed Laser Surg* **27**, 381-386. doi:10.1089/pho.2008.2280.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Roos-Jansaker, A. M., Renvert, H., Lindahl, C. & Renvert, S. (2007) Surgical treatment of peri-implantitis using a bone substitute with or without a resorbable membrane: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol* **34**, 625-632. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01102.x.
- Salvi, G. E., Persson, G. R., Heitz-Mayfield, L. J., Frei, M. & Lang, N. P. (2007) Adjunctive local antibiotic therapy in the treatment of peri-implantitis II: clinical and radiographic outcomes. *Clin Oral Implants Res* **18**, 281-285. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01377.x.
- Schwarz, F., Sahm, N., Bieling, K. & Becker, J. (2009) Surgical regenerative treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane: a four-year clinical follow-up report. *J Clin Periodontol* **36**, 807-814. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01443.x.
- Schwarz, F., Sahm, N., Mihatovic, I., Golubovic, V. & Becker, J. (2011) Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. *J Clin Periodontol* **38**, 939-949. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01739.x.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Nociti, F. H., Jr., Garcia, V. G. & Marcantonio, E., Jr. (2003) Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* **74**, 338-345. doi:10.1902/jop.2003.74.3.338.
- Shibli, J. A., Martins, M. C., Ribeiro, F. S., Garcia, V. G. & Nociti, F. H. (2006) Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* **17**. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01167.x.
- Tenenbaum, H., Bogen, O., Severac, F., Elkaim, R., Davideau, J. L. & Huck, O. (2016) Long-term prospective cohort study on dental implants: clinical and microbiological parameters. *Clin Oral Implants Res*. doi:10.1111/clr.12764.
- Wetzel, A. C., Vlassis, J., Caffesse, R. G., Hammerle, C. H. & Lang, N. P. (1999) Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **10**, 111-119.

TABLES

Table 1. Peri-implantitis defect characteristics pretreatment, and following antimicrobial tetracycline HCL (TTC) or photodynamic therapy (aPDT) with or without guided bone regeneration (GBR) (n= 8 animals; means $\pm$ SD in mm).

	TTC	aPDT	TTC/GBR	aPDT/GBR	<i>p-value</i>
Clinical defect characteristics					
Defect depth	1.8 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.9	0.06
Crestal level	0.9 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.9	0.12
Histometric parameters					
Pretreatment defect depth	2.3 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 1.2	0.13
Residual defect depth	1.3 $\pm$ 1.4	1.3 $\pm$ 1.0	1.4 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 1.5	0.85
Crestal bone level	0.8 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 1.3	0.8 $\pm$ 1.6	0.41
Linear bone gain	1.0 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.6	0.56
Bone gain (%)	53.1 $\pm$ 36.6	46.9 $\pm$ 26.9	49.9 $\pm$ 29.0	47.3 $\pm$ 28.5	0.89
Total osseointegration (%)	36.2 $\pm$ 21.9	35.5 $\pm$ 17.2	36.3 $\pm$ 21.3	27.6 $\pm$ 15.3	0.56
Osseointegration within new bone (%)	61.9 $\pm$ 21.5	61.0 $\pm$ 22.4	68.5 $\pm$ 22.2	59.2 $\pm$ 11.8	0.74

Table 2. Predictor variables for new bone formation and bone-implant contact (BIC) within new bone following antimicrobial tetracycline HCL (TTC) or photodynamic therapy (aPDT) with or without guided bone regeneration (GBR) (n=8 animals and 55 implants).

		Residual defect depth (mm)				Bone gain (mm)				BIC (%)			
		Coef	95%CI	<i>p-value</i>		Coef	95%CI	<i>p-value</i>		Coef	95%CI	<i>p-value</i>	
TTC/ aPDT	No	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Yes	0.06	-0.39	0.50	0.79	0.06	-0.15	0.27	0.59	0.00	-0.06	0.07	0.89
GBR	No	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Yes	0.36	-0.18	0.89	0.19	0.21	0.00	0.42	0.05	0.00	-0.12	0.12	0.98
Site	Buccal	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Lingual	-1.39	-2.10	-0.68	>0.001	0.38	0.15	0.61	0.001	0.04	-0.08	0.16	0.55
	Mesial	-0.91	-1.40	-0.42	>0.001	0.30	0.15	0.46	>0.001	-0.04	-0.23	0.15	0.68
	Distal	-0.91	-1.39	-0.43	>0.001	0.48	0.26	0.69	>0.001	-0.02	-0.16	0.12	0.76
Implant location	Anterior	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Posterior	-0.19	-0.46	0.09	0.18	0.24	0.08	0.41	0.004	0.01	-0.11	0.14	0.85
Implant exposure	No	ref	-	-	-	ref	-	-	-	ref	-	-	-
	Yes	1.67	1.12	2.22	>0.001	-0.59	-0.77	-0.42	>0.001	-0.28	-0.48	-0.08	0.006

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1. Study flowchart.

Figure 2. Dental implant installation (a); surgical placement of silk ligatures (b); tissue conditions at ligature removal (c); defect height assessment (d); implant surface debridement (e); and placement of BBM level with the cover screw (f) and the collagen membrane for GBR (g).

Figure 3. Representative photomicrographs of mesial/distal sectioned peri-implantitis defects following TTC, aPDT, TTC/GBR or aPDT/GBR.

Figure 4 Peri-implantitis site receiving aPDT/GBR or TTC/GBR Note BBM particles without evidence of resorption, erosion or support of bone formation encapsulated in dense connective tissue.

Study Flowchart
677x381mm (72 x 72 DPI)

Dental implant installation (a); surgical placement of silk ligatures (b); tissue conditions at ligature removal (c); defect height assessment (d); implant surface debridement (e); and placement of BBM level with the cover screw (f) and the collagen membrane for GBR (g).
451x364mm (300 x 300 DPI)

Representative photomicrographs of mesial/distal sectioned peri-implantitis defects following TTC, aPDT, TTC/GBR or aPDT/GBR.
152x210mm (300 x 300 DPI)

Peri-implantitis site receiving aPDT/GBR or TTC/GBR Note BBM particles without evidence of resorption, erosion or support of bone formation encapsulated in dense connective tissue.
663x275mm (72 x 72 DPI)

Anexo 2 - Artigo em Inglês Microbiologia

Lasers in Medical Science

Microbiologic effect of two antiinfective treatments on induced periimplantitis: a pilot study with DNA-DNA hybridization technique.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Microbiologic effect of two antiinfective treatments on induced periimplantitis: a pilot study with DNA-DNA hybridization technique.
Article Type:	Original Article
Keywords:	periimplantitis; antimicrobial photodynamic therapy; low level laser therapy
Corresponding Author:	Umberto Demoner Ramos Ramos, MsC Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto Ribeirao Preto, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Umberto Demoner Ramos Ramos, MsC
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Umberto Demoner Ramos Ramos, MsC Flávia Adelino Suaid, PhD Cristiano Susin, PhD Ulf WE Wikesjo, PhD Patricia Conde Vital, DDS Sérgio Luis Scombatti de Souza, PhD Michel Reis Messoria, PhD Mario Taba Jr., PhD Daniela Bazan Palioto, PhD Arthur Belém Novaes Jr., PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Aim: The aim of this pilot study is to evaluate two surface decontamination protocols on induced periimplantitis in beagle dogs.</p> <p>Methods: Eight beagle dogs received eight implants each. After 8 weeks, silk ligatures were installed and then removed after 8 weeks, and after the end of 10 weeks the lesions were treated either with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) or topical tetracycline hydrochloride 50mg/ml. Microbiological samples were taken before and after each treatment, from the most advanced proximal site per dog. The samples were then processed and analysis made with DNA-DNA hybridization checkerboard technique.</p> <p>Results: Overall results showed effective bacterial counts reduction for both treatments. Diseases induction successfully produced a periimplantitis lesion with similar microbiological characteristics of those are found in humans. aPDT showed better outcomes, with major reductions on the red complex, but no statistical difference between groups when adjusted for multiple comparisons.</p> <p>Conclusion: Both treatments were able to successfully decontaminate implant surfaces. Implant decontamination with aPDT can be used as a substitute to local antibiotics in periimplantitis treatment.</p>

TITLE: Microbiologic effect of two anti-infective treatments on ligature-induced peri-implantitis: a pilot study in the dog.

Abstract:

Aim: The aim of this pilot study is to evaluate two surface decontamination protocols on induced periimplantitis in beagle dogs.

Methods: Eight beagle dogs received eight implants each. After 8 weeks, silk ligatures were installed and then removed after 8 weeks, and after the end of 10 weeks the lesions were treated either with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) or topical tetracycline hydrochloride 50mg/ml. Microbiological samples were taken before and after each treatment, from the most advanced proximal site per dog. The samples were then processed and analysis made with DNA-DNA hybridization checkerboard technique.

Results: Overall results showed effective bacterial counts reduction for both treatments. Diseases induction successfully produced a periimplantitis lesion with similar microbiological characteristics of those are found in humans. aPDT showed better outcomes, with major reductions on the red complex, but no statistical difference between groups when adjusted for multiple comparisons.

Conclusion: Both treatments were able to successfully decontaminate implant surfaces. Implant decontamination with aPDT can be used as a substitute to local antibiotics in periimplantitis treatment.

Introduction

Peri-implantitis is an inflammatory disease caused by oral bacteria that leads to alveolar bone loss around osseointegrated dental implants (Lang et al., 2011). Its prevalence has been estimated at approximately 20% (Derks and Tomasi, 2015), and a 10% 10-year incidence has been reported in well-controlled patient populations (Cecchinato et al., 2014). Peri-implantitis microbiota has been shown to be similar to chronic periodontitis when analyzed (Shibli et al., 2008), consisting of increased proportions of bacterias from the red and orange complexes, especially on subgingival biofilm. Teeth have been pointed as microbial reservoirs for implant infection (Sumida et al., 2002), and patients with residual pockets after periodontal therapy have increased risk of periimplant disease (Cho-Yan Lee et al., 2012). In edentulous patients, structures such as tongue, tonsils also act as reservoirs (Quirynen et al., 2001).

Several treatment protocols, mostly based on adaptations of mechanical and chemical disinfection of periodontally affected root surfaces, have been proposed to manage peri-implantitis with mixed results. Whereas the implant surface disinfection remains a clinical challenge (Esposito et al., 2012), it is considered a key factor for the reconstruction of the lost peri-implant bone and reestablishment of the bone to implant contact, i.e. re-osseointegration (Persson et al., 2001).

Preclinical and clinical studies evaluated the use of systemic antibiotics such as amoxicillin and metronidazole with positive results (Ericsson et al., 1996, Heitz-Mayfield et al., 2012, Nociti et al., 2001b). In order to avoid the side effects associated with systemic use of antibiotics, local antibiotics in gel (Renvert et al., 2006) and solution formulations have been proposed (Park, 2012).

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has also been proposed as a local anti-infective treatment (de Oliveira et al., 2007). aPDT represents a technology in which

the bacterial intra- and extracellular structures are targeted by a photosensitizer that absorbs light energy, usually from a red laser source, and produces singlete oxygen and protein denaturation inside the bacteria, leading to bacterial cell death. Clinical studies have shown promising results following the use of aPDT in periodontal defects, with good results regarding microbiological control (Lulic et al., 2009, Ramos et al., 2016), specially in deep pockets (Moreira et al., 2015).

The aim of this study was to access the effects of two anti-infective treatments on the surface of implants after the induction of peri-implantitis in dogs.

Material and Methods

This study followed a protocol approved by the Animal Experimental Ethics Committee, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil (protocol number 06.1.458.53.5). The study was divided into two phases: 1) Preparation for and induction of ligature-induced peri-implantitis; and 2) Treatment of induced peri-implantitis defects using different anti-infective therapies.

Animals

Eight male purpose-bred Beagle dogs, 18-24 months old, approximate weight 15 kg, obtained from a licensed vendor, were used. The animals were individually housed and had *ad libitum* access to water and standard laboratory soft dog-food-diet throughout the study.

Materials and devices

Titanium dental implants (BoneLevel TML SLA, ø3.3x10 mm, Straumann, Basel, Switzerland) and healing abutments (ø4.1x3.5 mm, Straumann, Basel, Switzerland) were used.

For the aPDT, a hand-held, battery-operated, diode laser (HELBO mini-laser 2075 F dent, HELBO Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) was used. The device was set to a wavelength of 660 nm and fluency of 212 mW/cm². The laser was irradiated through an 8.5-cm long flexible fiber optic tip curved at a 60° angle with a 0.06 cm spot-size. A 10-mg/mL phenothiazine chloride solution (HELBO Blue Photosensitizer, HELBO Photodynamic Systems, Grieskirchen, Austria) was used as photosensitizer.

Surgical procedures

Food was withheld the night preceding surgeries. For all surgical procedures, the animals were pre-anesthetized using 10% zolazepam (0.10 mL/kg IM) and acepromazine (0.2-0.3 mg/kg IM). The animals were then maintained on gas anesthesia (isoflurane 1-2% to effect). Depth of anesthesia was monitored by lack of response to toe pinch, lack of corneal reflex, and by monitoring depth of respiration, respiratory rate, and heart rate; all anesthesia and related procedures performed and monitored by veterinary staff. Routine dental infiltration anesthesia (mepivacaine 2% norepinephrine 1:100,000) was used at the surgical sites.

An opioid (tramadol 3 mg/kg BID) and a non-steroidal anti-inflammatory agent (ketoprofen 1 mg/kg IM **SID**) were used for postoperative pain control.

Peri-implantitis induction

Flapless bilateral surgical extractions of the mandibular 1st, 2nd, 3rd, and 4th premolar and 1st molar teeth were performed. Atraumatic extractions were secured by bi-sectioning the teeth using a high-speed hand-piece and elevators. Interrupted sutures (5.0 Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson, São Jose dos Campos, Brazil) were placed for wound

closure and primary intention healing. Sutures were removed at 2 wks, the extraction sites allowed to heal for an additional 6 wks.

For implant placement, mid-crestal incisions were done, and buccal and lingual mucoperiosteal flaps were raised to expose the edentulated alveolar ridge. Osteotomies were prepared following the manufacturer's protocol, 4 dental implants placed in each mandibular jaw quadrant. Flaps were sutured using non-resorbable sutures (5-0 Mononylon Ethicon, São Jose dos Campos, Brazil) to allow transmucosal healing. Sutures were removed at 2 wks, the surgical sites were then allowed to heal for an additional 6 wks.

For peri-implantitis induction, silk ligatures (3-0 Silk Ethicon, Johnson & Johnson, São Jose dos Campos, Brazil) were placed around the healing abutments over 8 wks. Ligatures were checked weekly and missing ligatures immediately replaced. Ligatures were then removed and peri-implant lesions were allowed to progress undisturbed for an additional 6 wks. The standard dog-food-diet was wetted to a slurry during peri-implantitis induction to support dental plaque accumulation.

Peri-implantitis treatment

A mucoperiosteal flap was elevated without releasing incisions. The peri-implantitis defects were then thoroughly debrided from granulation tissue, and the dental implants were instrumented using plastic curettes (Implacare-IMPHDL6, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Implants were then allocated to one of the following treatments:

- **TTC:** Cotton pellets were soak-loaded with a tetracycline HCL (50 mg/mL) solution, then the exposed implant was conditioned with tetracycline HCL for 3 min, the cotton pellets substituted every 30 sec. The surgical site was then thoroughly irrigated using sterile saline.
- **aPDT:** Peri-implant defects were filled to capacity with the photosensitizer, the solution left in place for 5 min. Then, defects were throughoutly irrigated using

saline to remove the solution and avoid optical shielding. The implant surface was divided into six areas and the laser was applied for 30 sec over each area for a total dose of 44 J/cm².

Microbiological analysis

Biofilm was collected at the deepest peri-implant defect before mechanical debridement, and after TTC or aPDT treatment, one implant per group by swabbing with sterile microbrushes. Samples were conditioned in centrifuge tubes with 100µl of a solution with 10mM Tris-HCL and 1mM EDTA, pH 7.6. The collection was carried out trans-surgically with all efforts to maintain the collection site isolated and prevent contamination.

After collection and conditioning, 100µl of a 0.5mM NaOH solution were added to the centrifuge tube. Samples were then dispersed using a vortex mixer, and bacteria counts of 40 species were estimated using checkerboard DNA-DNA hybridization technique (Table 1) (Mestnik et al., 2010). Signals were evaluated visually by comparing standards at 10⁵ and 10⁶ bacterial cells for the test species on the same membrane by an experienced examiner. The scores ranged from 0 to 5 as follows: 0, not detected; 1, <10⁵ cells; 2, 10⁵ cells; 3, 10⁵ to 10⁶; 4, 10⁶; 5, >10⁶.

Statistical analysis

Non-parametric statistical methods were used for the statistical analysis. Median, 25 and 75 percentiles were calculated and reported for bacteria counts before and following treatment. The count reductions between before and after treatment (delta) were also compared between groups. Mann-Whitney two-sample tests were used to compare between groups, and Wilcoxon matched-pairs signed-ranks tests were used for within group comparisons. The animal was the unit of analysis, and the p-value was set to 5%. A comparison was considered statistically significant if the calculated p-value was <0.00125 to account for multiple comparisons (0.05/40 bacteria species).

Results

Overall, results showed that ligature-induced peri-implantitis lead to a microbiota characterized by a predominance of bacteria of the red (11% and 16%) and orange (38% and 40%) complexes, respectively. Very low levels of *A. actinomycetencomitans* (<1%), and low proportions of yellow, blue, and purple complexes were observed in both groups at

baseline (Figs. 1 and 2). No significant differences were observed between treatments for any bacteria species at baseline.

Following treatment, a major reduction in bacteria counts for all bacteria species was observed (Table 2). Whereas the aPDT group had generally lower bacteria counts than TTC (aPDT: >1%; TTC: 6%), no significant differences were observed between groups following treatment (Fig. 3). Similarly, no significant differences were observed in the amount of bacterial reduction between groups.

Discussion

This microbiological pilot study was carried out to evaluate the effects of two anti-infective therapies on the surgical treatment ligature-induced periimplantitis in a dog model. The proportion of bacteria of the red (11 to 16%) and orange (38 to 40%) complexes observed in the present study before treatment is compatible with the bacterial composition reported on previous reports involving humans (17.2% and 46%) (Shibli et al., 2008).

Overall results showed a tendency towards greater reduction on bacterial counts and proportions favoring aPDT, but no statistically significant difference was detected. To date, very few preclinical studies have evaluated the microbiological outcomes of implant surface decontamination (Shibli et al., 2003, Nociti et al., 2001a). None of them evaluated treatment effects using molecular microbiological techniques such as the DNA-DNA checkerboard hybridization technique, a less laborious technique that encompasses a greater number of species than traditional culture and polymerase chain reaction methods.

Despite the fact that the DNA-DNA hybridization technique used herein was based on probes designed for human strains, it detected bacterias from dog microbiota. Previously, studies that used the same technique to characterize oral microbiota in dogs, successfully detected bacteria using human strains probes (Rober et al., 2008), possibly by cross-reaction (Dahlen et al., 2012). Nevertheless, further studies should be carried out with probes specially designed for dogs oral flora.

It is important to acknowledge that implant surface contamination following treatment cannot be fully ruled out since all sampling procedures were performed trans-surgically. Nevertheless, all efforts to maintain the sampling sites isolated and prevent contamination were undertaken. Despite the numerical difference between the two groups, no statistical difference was detected, probably due to the reduced sample

number. Further studies should be carried out with a greater number of animals to better elucidate the treatment effects.

The disease induction showed similar composition of the clinical studies on periimplantitis microbiota with use the Checkerboard technique. However, when analysed by means of 16s gene clone library and PCR real time, periimplantitis microbioma shares some of the classic periodontopathogens, mainly the red complex bacterias, but some of the synergistic association had been different between those two diseases, with a more complex microbiota found on implants(Koyanagi et al., 2013, Maruyama et al., 2014).

The performance of aPDT seemed to be slightly better, but with no statistical significance, then a local antibiotic applied directly on the implant surface. Decontamination seems to be one of the key factors for infection resolution and re-osseointegration, and the use of aPDT may be valuable to achieve it, without inconvenient side effects. Furthermore, there is a growing interest on novel antimicrobial strategies in order to replace the use of commonly used antibiotics in order to avoid the selection of multi-resistant bacteria (Levy and Marshall, 2004, Needleman and Wisson, 2006). Thus, strategies such as aPDT may be valuable to overcome the use of systemic antibiotics in periimplantitis situation and should be considered in further researches. In addition, the protocol described in this study can still be optimized by the increase of the exposure time, achieving higher antimicrobial activity (Bhatti et al., 1997, Luan et al., 2009).

Conclusion

Within the limitations of the present study, both antiinfective therapies showed to reduced overall bacterial counts, with remarked reductions of the red and orange complex, with a slightly better performance favoring aPDT. Further studies should be carried out to characterize the microbioma of the induced periimplantitis and fully evaluate the antiinfective treatments on implant surface, based on the local microbioma. aPDT seems to be a valuable alternative to the use of common antibiotics.

References

- Bhatti, M., MacRobert, A., Meghji, S., Henderson, B. & Wilson, M. (1997) Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol* **65**, 1026-1031.
- Cecchinato, D., Parpaiola, A. & Lindhe, J. (2014) Mucosal inflammation and incidence of crestal bone loss among implant patients: a 10-year study. *Clin Oral Implants Res* **25**, 791-796. doi:10.1111/clr.12209.
- Cho-Yan Lee, J., Mattheos, N., Nixon, K. C. & Ivanovski, S. (2012) Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clin Oral Implants Res* **23**, 325-333. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02264.x.
- Dahlen, G., Charalampakis, G., Abrahamsson, I., Bengtsson, L. & Falsen, E. (2012) Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *J Periodontol Res* **47**, 354-364. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01440.x.
- de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., Jr. & Taba, M., Jr. (2007) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. *J Periodontol* **78**, 965-973. doi:10.1902/jop.2007.060494.
- Derks, J. & Tomasi, C. (2015) Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol* **42 Suppl 16**, S158-171. doi:10.1111/jcpe.12334.
- Ericsson, I., Persson, L. G., Berglundh, T., Edlund, T. & Lindhe, J. (1996) The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **7**, 320-328.
- Esposito, M., Grusovin, M. G. & Worthington, H. V. (2012) Interventions for replacing missing teeth: treatment of periimplantitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD004970.pub5.
- Heitz-Mayfield, L. J. A., Salvi, G. E., Mombelli, A., Faddy, M., Lang, N. P. & Implant Complication Res, G. (2012) Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* **23**. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02276.x.
- Koyanagi, T., Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Maruyama, N., Ohkuma, M. & Izumi, Y. (2013) Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* **40**, 218-226. doi:10.1111/jcpe.12047.
- Lang, N. P., Berglundh, T. & Working Group 4 of Seventh European Workshop on, P. (2011) Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **38 Suppl 11**, 178-181. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x.
- Levy, S. B. & Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* **10**, S122-129. doi:10.1038/nm1145.
- Luan, X. L., Qin, Y. L., Bi, L. J., Hu, C. Y., Zhang, Z. G., Lin, J. & Zhou, C. N. (2009) Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci* **24**. doi:10.1007/s10103-007-0513-3.
- Lulic, M., Leiggener Gorog, I., Salvi, G. E., Ramseier, C. A., Mattheos, N. & Lang, N. P. (2009) One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-

- controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **36**, 661-666.
doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01432.x.
- Maruyama, N., Maruyama, F., Takeuchi, Y., Aikawa, C., Izumi, Y. & Nakagawa, I. (2014) Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci Rep* **4**, 6602. doi:10.1038/srep06602.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Lira, E. A. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **37**, 353-365. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01538.x.
- Moreira, A. L., Novaes, A. B., Jr., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B., de Oliveira, P. G., Casati, M. Z., Casarin, R. C. & Messoria, M. R. (2015) Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. *J Periodontol* **86**, 376-386. doi:10.1902/jop.2014.140392.
- Needleman, I. & Wisson, M. (2006) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* **33**, 157; author reply 157-158. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00894_1.x.
- Nociti, F. H., de Toledo, R. C., Machado, M. A. N., Stefani, C. M., Line, S. R. P. & Gonçalves, R. B. (2001a) Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* **12**. doi:10.1034/j.1600-0501.2001.012004295.x.
- Nociti, F. H., Jr., Machado, M. A., Stefani, C. M. & Sallum, E. A. (2001b) Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs: a histometric investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* **16**, 646-652.
- Park, J. B. (2012) Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone and tetracycline: a case report. *Gerodontology* **29**, 145-149. doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00470.x.
- Persson, L. G., Berglundh, T., Sennerby, L. & Lindhe, A. (2001) Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces - An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **12**. doi:10.1034/j.1600-0501.2001.120607.x.
- Quirynen, M., De Soete, M., Dierickx, K. & van Steenberghe, D. (2001) The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol* **28**, 499-507.
- Ramos, U. D., Ayub, L. G., Reino, D. M., Grisi, M. F., Taba, M., Jr., Souza, S. L., Palioto, D. B. & Novaes, A. B., Jr. (2016) Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics. *J Clin Periodontol* **43**, 147-155. doi:10.1111/jcpe.12498.
- Renvert, S., Lessem, J., Dahlen, G., Lindahl, C. & Svensson, M. (2006) Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **33**. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.00919.x.

- 1 Rober, M., Quirynen, M., Haffajee, A. D., Schepers, E. & Teughels, W. (2008) Intra-
2 oral microbial profiles of beagle dogs assessed by checkerboard DNA-
3 DNA hybridization using human probes. *Vet Microbiol* **127**, 79-88.
4 doi:10.1016/j.vetmic.2007.08.007.
5
6 Shibli, J. A., Martins, M. C., Lotufo, R. F. M. & Marcantonio, E. (2003) Microbiologic
7 and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with
8 different dental implant surfaces. *International Journal of Oral &*
9 *Maxillofacial Implants* **18**.
10
11 Shibli, J. A., Melo, L., Ferrari, D. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M. & Feres, M. (2008)
12 Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy
13 and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* **19**, 975-982.
14 doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x.
15
16 Sumida, S., Ishihara, K., Kishi, M. & Okuda, K. (2002) Transmission of periodontal
17 disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant
18 regions. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**, 696-702.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figures and tables.

Table 1. Bacterial species strains used on DNA-DNA hybridization Checkerboard technique.

Species	Strain
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104*
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823*
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277*
<i>A. actinomycetenum</i> (a+b)	43718* + 29523*
<i>F.n. (sp. vincentii)</i>	49256*
<i>Campylobacter rectus</i>	33238*
<i>Treponema Socranskii</i>	S1¶
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271*
* <i>Parvimonas micra</i>	33270*
<i>Veillonella parvula</i>	10790*
<i>Actinomyces oris</i>	43146*
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397*
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556*
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860*
<i>Streptococcus oralis</i>	35037*
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596*
<i>Actinomyces israeli</i>	12102*
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335*
<i>Treponema denticola</i>	B1¶
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563*
<i>Actinomyces odontolyticus</i> I	17929*
<i>F.n. (sp. polymorphum)</i>	10953*
<i>Campylobacter showae</i>	51146**
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693*
<i>Neisseria mucosa</i>	19696*
<i>Fusobacterium nucleatum (sp. nucleatum)</i>	25586*
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624*
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558*
<i>Tannerella forsythia</i>	43037*
<i>Selenomonas noxia</i>	43541*
<i>Propionibacterium acnes</i> (I + II)	11827* + 11828*
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845*
<i>Streptococcus mitis</i>	49456*
<i>Eikenella corrodens</i>	23834*
<i>Gemella morbillorum</i>	27824*
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612*
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201*
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236*
<i>Prevotella intermedia</i>	25611*

Table 2. Reduction in subgingival species following treatments. Median, 25 and 75 percentiles of bacteria counts X 1,000

	TTC				aPDT				
	Median	25%	75%	p value before vs. after*	Median	25%	75%	p value before vs. after*	p value TTC vs. TFA*
T Socranskii	5	0	90	0.33	55	0	100	0.05	0.16
E Saburreum	5	0	500	0.45	450	0	1000	0.19	0.28
S anginosus	10	0	400	0.34	250	0	500	0.05	0.43
N mucosa	500	0	9500	0.52	5400	0	10000	0.09	0.29
S noxia	0	0	490	0.57	500	0	500	0.046	0.33
P acnes	0	0	10	0.56	5	0	10	0.08	0.32
G morbillorum	250	0	990	0.19	295	0	500	0.09	0.75
L buccalis	50	-100	900	0.53	995	100	10000	0.035	0.46

* Wilcoxon signed-rank test

Figure 1. Distribution of bacteria complexes according to experimental group after disease induction.

Figure 2. Median bacterial counts before and after treatment.

Title Page

TITLE: Microbiologic effect of two anti-infective treatments on ligature-induced peri-implantitis: a pilot study in the dog.

Umberto Demoner Ramos*, Flavia Suaid**, Ulf ME Wiksejo***, Cristiano Susin***,

Patrícia Conde Vital****, Sérgio Luis Scombatti de Souza*****, Michel Reis

Messora*****, Mario Taba Jr. *****, Daniela Bazan Palioto*****, Arthur Belém Novaes

Jr.*****

*PhD Student at University of São Paulo (FORP-USP)

**PhD, University of São Paulo(FORP-USP)

***Laboratory for Applied Periodontal & Craniofacial Regeneration (LAPCR), Augusta

University, Dental College of Georgia, Augusta, GA, USA

**** Graduate student at University of São Paulo(FORP-USP)

***** PhD, Professor at University of São Paulo (FORP-USP)

Correspondent author: Umberto Demoner Ramos

Email: umbertodramos@gmail.com

Address: Rua misael pedreira da silva, 98 sala 102

Zip code 29056-230 Vitonia-ES, Brazil

Aim: The aim of this pilot study is to evaluate two surface decontamination protocols on induced periimplantitis in beagle dogs.

Methods: Eight beagle dogs received eight implants each. After 8 weeks, silk ligatures were installed and then removed after 8 weeks, and after the end of 10 weeks the lesions were treated either with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) or topical tetracycline hydrochloride 50mg/ml. Microbiological samples were taken before and after each treatment, from the most advanced proximal site per dog. The samples were then processed and analysis made with DNA-DNA hybridization checkerboard technique.

Results: Overall results showed effective bacterial counts reduction for both treatments. Diseases induction successfully produced a periimplantitis lesion with similar microbiological characteristics of those are found in humans. aPDT showed better outcomes, with major reductions on the red complex, but no statistical difference between groups when adjusted for multiple comparisons.

Conclusion: Both treatments were able to successfully decontaminate implant surfaces. Implant decontamination with aPDT can be used as a substitute to local antibiotics in periimplantitis treatment.

Keywords: Periimplantitis, antimicrobial photodynamic therapy, tetracycline, checkerboard

Figure

[Click here to download Figure figure 2.tif](#)

Figure

[Click here to download Figure figure 1.tiff](#)